

ERLY LUISANA CARRASCAL TRIANA

**EFEITO DO RESFRIAMENTO E DA ASSOCIAÇÃO DE CRIOPROTETORES,
PENETRANTES, NÃO PENETRANTE E ÁCIDO ASCÓRBICO NA
QUALIDADE DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS VITRIFICADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C313e
2012

Carrascal Triana, Erly Luisana, 1986-
Efeito do resfriamento e da associação de crioprotetores,
penetrantes, não penetrante e ácido ascórbico na qualidade
de folículos pré-antrais bovinos vitrificados / Erly Luisana
Carrascal Triana. – Viçosa, MG, 2012.
xv, 52f. : il. ; (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 33-52.

1. Reprodução animal. 2. Bovino - Reprodução.
3. Ovários - Criopreservação. 4. Biotecnologia. 5. Gônadas.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

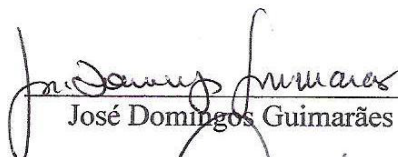
CDD 22. ed. 636.0824

ERLY LUISANA CARRASCAL TRIANA

**EFEITO DO RESFRIAMENTO E DA ASSOCIAÇÃO DE CRIOPROTETORES,
PENETRANTES, NÃO PENETRANTE E ÁCIDO ASCÓRBICO NA
QUALIDADE DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS VITRIFICADOS**

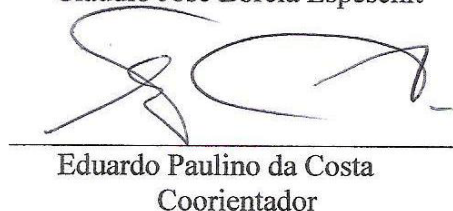
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 25 de julho de 2012.


José Domingos Guimarães


Cláudio José Borela Espescht


Giovanni Ribeiro de Carvalho
Coorientador


Eduardo Paulino da Costa
Coorientador


Ciro Alexandre Alves Torres
Orientador

Aos meus amados pais, Pedro e Amparo, pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial, a Deus, fonte que guia que ilumina os meus caminhos, pela proteção, força e eterna presença.

Aos meus pais queridos, Pedro Carrascal e Amparo Triana, pelos valores morais ensinados, por terem me proporcionado educação, apoio e incentivo incondicional, muito obrigada pelo amor incomensurável.

Aos meus irmãos, Efren David e Pedro Andrés, por serem exemplos de pessoas, pela torcida e carinho sincero.

A minha segunda mãe Yaneth Carrascal pelo amor constante e verdadeiro. Agradeço a toda minha família, que estão sempre vibrando com cada conquista minha.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e capacitação profissional.

Ao Professor Ciro Alexandre Alves Torres pela confiança dispensada, oportunidade e orientação durante toda a execução deste trabalho.

Ao professor Eduardo Paulino de Costa pelos ensinamentos, colaboração e atenção incomparável sempre que solicitado.

Ao professor José Domingos Guimarães por ser exemplo como profissional e por seus relevantes ensinamentos durante meu estágio.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite e pela disposição para analisar este trabalho.

Ao professor Joaquim Patarroyo por sua inestimável ajuda e pela viabilização do experimento.

Ao professor Claudio Borela, por ser meu amigo e padrinho, muito obrigada pelo carinho e excelentes conselhos.

Agradeço ao Dr. José Ricardo de Figueiredo pela confiança, ensinamentos e apoio dispensado no estágio. À grande equipe LAMOFOPA, pela valiosa atenção, estímulo e acolhimento.

Ao Javier Garcés Cárdenas, pelo amor, carinho, companheirismo e compreensão, sempre me apoiando e incentivando. Obrigada por acreditar em mim!

À grande amiga que conquistei em Fortaleza, Márcia Viviane Alves Saraiva, por quem tenho imenso carinho e admiração, meus sinceros agradecimentos por ter me acolhido e pelos momentos maravilhosos, conversas e apoio incondicional.

Às minhas amigas do coração: Tefy e Monica, pois a distância não nos separa nem minimiza nosso carinho. A Vanessa e Igduara pelos ótimos momentos que a gente compartilhou na graduação, continuaremos sendo sempre Las Chicas Superpoderosas!!

A Yurani Mejia, que mesmo estando distante, a minha amizade e o meu coração sempre estará disponível para você.

A meu grande amigo Jesus Manuel Viola, pela amizade sincera, por estar sempre presente nos momentos bons e de dificuldade.

Às Mongas! Amandinha, Lara e Ana Cristina, nosso tempo de convívio foi pouco, mas o suficiente para que virasse uma amizade para toda a vida!

A Carolina Rodriguez, pela amizade que construímos, além da ajuda, conselhos, conhecimentos e momentos bons compartilhados.

A Lídia, Giovanna, Naira e Barbara, Obrigada pela convivência, companhia, conversas e pelas diferenças de opiniões que me fizeram crescer.

A meus colegas Jurandy, Julio, Madriano e Carlos, que me deram apoio e carinho durante esta jornada. Em especial Jurandy por toda a paciência e auxílio prestada.

A minhas estagiarias Jovana e Renata muito obrigada pelo auxílio e cooperação, foram de grande ajuda para a realização deste trabalho.

A Guainobi, “mamãe brasileira”, por ter sido a minha primeira professora de português, pelos valiosos conselhos e por me acolher carinhosamente.

A Gabriela Santistevan, chamada carinhosamente de Gabs! Uma pessoa fantástica, cheia de energia, prestando auxílio sempre que necessário, pelos momentos de muitas risadas, obrigada!

Aos irmãos Gabriel e Marela Tafur, por serem pessoas fantásticas, prestativos e pelos inúmeros momentos bons compartilhados.

A toda a galera colombiana “Gracias”, mais que amigos foram uma grande família em Viçosa (Terra do nunca).

Aos funcionários do Laboratório de Histologia e Parasitologia no Departamento de Medicina Veterinária e do Laboratório de Biologia Estrutural no Departamento de Biologia.

A todos os que não foram aqui mencionados, mas que contribuíram direta ou indiretamente a atingir mais uma etapa da minha vida, meus sinceros agradecimentos cada palavra, incentivo e carinho estão guardados no meu coração.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

ERLY LUISANA CARRASCAL TRIANA, filha de Pedro José Carrascal Carrascal e Amparo Triana Dominguez, nasceu em 23 de abril de 1986, na cidade de Montelíbano, Córdoba – Colômbia. Em Fevereiro de 2005, ingressou no curso de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de Córdoba – Colômbia, e concluiu o curso superior em 2010. Em Agosto de 2010, ingressou no curso de pós-graduação, ao nível de Mestrado, sob orientação do Professor Ciro Alexandre Alves Torres, na área de concentração em Reprodução Animal, no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais – Brasil e concluiu, em Julho de 2012, com a defesa da Dissertação “Efeito do resfriamento e da associação de crioprotetores penetrantes, não penetrante e ácido ascórbico na qualidade de folículos pré-antrais bovinos vitrificados”.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 O ovário dos mamíferos.....	03
2.2 Folículos ovarianos, classificação e caracterização estrutural.....	04
2.3 População e atresia folicular.....	06
2.4 Conservação de folículos pré-antrais.....	08
2.4.1 Resfriamento.....	08
2.4.2 Criopreservação.....	09
2.4.2.1 Princípios básicos da Criopreservação.....	10
2.4.2.2 Agentes crioprotetores.....	10
2.4.2.3 Métodos de congelamento.....	12
2.5 Estresse oxidativo e o Ácido Ascórbico.....	14
2.6 Métodos de avaliação de FOPAs resfriados e vitrificados.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Local de execução do trabalho.....	17
3.2 Protocolo experimental.....	17
3.2.1 Experimento I: Morfologia de folículos ovarianos pré-antrais bovinos, resfriados a 4 °C por quatro e 24 horas e vitrificados em solução de DMSO e EG acrescidos ou não de SAC e/ou AA.....	17
3.2.1.1 Vitrificação dos FOPAs bovinos in situ.....	18
3.2.1.2 Aquecimento e remoção dos crioprotetores.....	19
3.2.1.3 Análise morfológica.....	19
3.2.1.4 Classificação de folículos pré-antrais.....	19

3.2.2 Experimento II: Viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais bovinos, resfriados a 4 °C por quatro e 24 horas e vitrificados em solução de DMSO e EG acrescidos ou não de SAC e/ou AA.....	21
3.2.2.1 Análise da viabilidade folicular.....	21
3.3 Análises estatística.....	23
4. RESULTADOS.....	24
5. DISCUSSÃO.....	28
6. PERSPECTIVAS.....	32
7. CONCLUSÕES.....	33
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	-	<i>Ascorbic Acid</i> (Ácido Ascórbico)
ACP	-	Agente crioprotetor
ASB	-	Albumina Sérica Bovina
AT	-	Azul de Trypan
CF	-	Controle fresco
CG	-	Células da Granulosa
C4h	-	Controle 4 horas
C24h	-	Controle 24 horas
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
EG	-	Etilenoglicol
FOPAs	-	Folículos Ovarianos Pré-Antrais
FSH	-	Hormônio Folículo Estimulante
GLY	-	Glicerol
h	-	Hora
HEPES	-	(4 - (2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfónico)
HC	-	Histologia Clássica
IM	-	Isolamento Mecânico
KDa	-	Kilodaltons
L	-	Litros
LH	-	Hormônio Luteinizante
M	-	Molar
Mg	-	Miligramas
mm ³	-	Milímetros cúbicos
mM	-	Milimolar
mL	-	Mililitros
MOIFOPA	-	Manipulação de Oócitos inclusos em Folículos Pré-Antrais
MT	-	Meio de Transporte (TCM-199+HEPES+Antibióticos)
µm	-	Micrometros
µL	-	Microlitros

N (n)	-	Numero
PAS	-	Ácido Periódico de Schiff
pH	-	Potencial de Hidrogênio
PROH	-	Propanodiol
ROS	-	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
SAC(SUC)	-	<i>Sucrose</i> (Sacarose)
SNK Test	-	Student Newman Keuls Test
SS	-	Solução Salina
TCM-199	-	Tissue culture medium-199
UFV	-	Universidade Federal de Viçosa
V4a	-	Vitrificação de tecidos ovarianos resfriados por 4 horas na solução: DMSO+EG
V4b	-	Vitrificação de tecidos ovarianos resfriados por 4 horas na solução: DMSO+EG+SAC
V4c	-	Vitrificação de tecidos ovarianos resfriados por 4 horas na solução: DMSO+EG+AA
V4d	-	Vitrificação de tecidos ovarianos resfriados por 4 horas na solução: DMSO+EG+SAC+AA
V24a	-	Vitrificação de tecidos ovarianos resfriados por 24 horas na solução: DMSO+EG
V24b	-	Vitrificação de tecidos ovarianos resfriados por 24 horas na solução: DMSO+EG+SAC
V24c	-	Vitrificação de tecidos ovarianos resfriados por 24 horas na solução: DMSO+EG+AA
V24d	-	Vitrificação de tecidos ovarianos resfriados por 24 horas na solução: DMSO+EG+SAC+AA
°C	-	Graus Celsius
%	-	Porcentagem
>	-	Maior que
<	-	Menor que

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Representação esquemática do ovário mamífero e suas principais estruturas.....	03
Figura 2. Representação esquemática da organização molecular em estado líquido (A), estado sólido formado na congelção lenta (B) e estado vítreo caracterizado por um sólido amorfo formado no processo de vitrificação (C).....	13
Figura 3. Fragmentos do córtex ovariano bovino.....	17
Figura 4. Criotubos para vitrificação de FOPAs bovinos inclusos no tecido ovariano.....	18
Figura 5. Representação esquemática da análise morfológica de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano bovino.....	20
Figura 6. Representação esquemática da análise da viabilidade de folículos pré-antrais isolados mecanicamente do tecido ovariano bovino.....	22
Figura 7. Folículos pré-antrais mecanicamente isolados e expostos ao corante vital azul de Trypan.....	26

LISTA DE TABELAS

	Pagina
Tabela 1. Número de folículos primordiais nos ovários de bovinos em função da idade do animal.....	07
Tabela 2. Tratamentos de vitrificação de fragmentos ovarianos bovinos contendo folículos pré-antrais resfriados por quatro e 24 horas.....	18
Tabela 3. Análise morfológica de FOPAs bovinos frescos e após resfriamento a 4 °C, durante quatro e 24 horas.....	24
Tabela 4. Percentual de FOPAs morfológicamente normais ou degenerados após vitrificação.....	25
Tabela 5. Viabilidade de folículos pré-antrais isolados do tecido ovariano bovino, após resfriamento e vitrificação.....	27

RESUMO

CARRASCAL, Erly Luisana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2012. **Efeito do resfriamento e da associação de crioprotetores, penetrantes, não penetrante e ácido ascórbico na qualidade de folículos pré-antrais bovinos vitrificados.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Coorientadores: Giovanni Ribeiro de Carvalho e Eduardo Paulino da Costa.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do resfriamento e da associação de crioprotetores penetrantes e não penetrante acrescido de ácido ascórbico na qualidade de folículos pré-antrais (FOPAs) bovinos vitrificados. Para isso, foram realizados dois experimentos. No experimento I, foi estudada a morfologia dos FOPAs após resfriamento seguido de vitrificação. Ovários (n=10) foram coletados de cinco novilhas mestiças de 14 a 16 meses de idade. No laboratório, 22 fragmentos ovarianos foram retirados da região cortical, os quais foram distribuídos: dois para controle fresco (zero hora), sendo imediatamente fixados para análise histológica, e 20 fragmentos resfriados à 4 °C por quatro e 24 horas em meio TCM-199+HEPES e antibióticos. Dos 20 fragmentos resfriados, quatro foram fixados como controle 4 e 24 horas (dois fragmentos cada) e os 16 restantes foram distribuídos em quatro tratamentos de vitrificação para cada tempo de resfriamento, respectivamente: Tratamentos V4a e V24a: TCM-199 + Etilenoglicol (EG) 1,5M + Dimetilsulfoxido (DMSO) 1,5M; Tratamentos V4b e V24b: TCM-199 + DMSO 1,5M + EG 1,5M + sacarose (SAC) 0,5M; Tratamentos V4c e V24c: TCM-199 + DMSO 1,5M + EG 1,5M + Ácido Ascórbico (AA) 0,1 mM/L e tratamentos V4d e V24d: TCM-199 + DMSO 1,5M + EG 1,5M + SAC 0,5M + AA 0,1mM/L. Após a vitrificação, os fragmentos permaneceram armazenados em Nitrogênio Líquido por três dias, e posteriormente aquecidos em soluções decrescentes de SAC e fixados para histologia clássica. No experimento II, foi estudada a viabilidade dos FOPAs após resfriamento seguido de vitrificação pela coloração Azul de Trypan (AT). Ovários bovinos (n=10) foram coletados, fragmentados e distribuídos nos quatro tratamentos conforme descrito no experimento I, os quais foram posteriormente submetidos ao isolamento folicular mecânico para análise da viabilidade. A variável morfologia foi avaliada pelo Teste SNK e a viabilidade foi analisada pelo teste Qui-quadrado com nível de significância de 5%, ou pelo Teste Exato de Fisher quando o número de repetições foi menor que 30 folículos. Não houve diferença na porcentagem de folículos morfologicamente normais entre o grupo controle

fresco e o grupo controle 4 h (99,3% e 96,0% respectivamente; $P > 0,05$). Entretanto, houve redução da integridade morfológica dos FOPAs após 24 h de resfriamento (controle 24 h: 86%; $P < 0,05$). Após a vitrificação, houve uma redução da integridade morfológica e viabilidade folicular em todos os tratamentos em relação aos controles resfriados ($P < 0,05$). No entanto, o tratamento V4c manteve a viabilidade folicular semelhante ao controle 24 h ($P > 0,05$). Este mesmo tratamento (V4c) mostrou maior capacidade de preservação em relação aos demais tratamentos de vitrificação ($P < 0,05$). Em conclusão, FOPAs inclusos no tecido ovariano bovino conservam a morfologia eficientemente quando são resfriados a 4 °C por até quatro horas em meio TCM-199+HEPES+Antibióticos. Além disso, a associação dos agentes crioprotetores penetrantes DMSO / EG, com o agente antioxidante AA melhora as taxas de sobrevivência e mantêm a integridade morfológica durante a vitrificação.

ABSTRACT

CARRASCAL, Erly Luisana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Cooling effects and association of penetrant, non-penetrant cryoprotectors and ascorbic acid on the quality of vitrified bovine preantral follicles.** Advisor: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-advisors: Giovanni Ribeiro de Carvalho and Eduardo Paulino da Costa.

The present study aimed to evaluate the cooling effects and association of penetrant, non-penetrant cryoprotectors and ascorbic acid on the quality of vitrified bovine preantral follicles (FOPAs). Two experiments were conducted. In experiment I, the morphology of FOPAs after cooling followed by vitrification was studied. Ovaries were collected (n=10) from five crossbred heifers aged of 14 to 16 months. At the laboratory 22 ovarian fragments were taken from the cortical region and distributed as followed: two fragments for fresh control (zero hour) submitted to histological analysis and 20 fragments cooled at 4 °C for four and 24 hours in TCM-199+HEPES+Antibiotics medium. From the 20 fragments cooled, four were fixed as control 4 and 24 hours (two piece each) and the remaining 16 fragments were distributed in four vitrification treatments for each cooling time, respectively: Treatments V4a and V24a: TCM-199 + dimethyl sulfoxide (DMSO) 1.5M + Ethylene glycol (EG) 1.5M; Treatments V4b and V24b: TCM-199 + DMSO 1.5M + EG 1.5M + sucrose (SUC) 0.5M; Treatments V4c and V24c: TCM-199 + DMSO 1.5M + EG 1.5M + Ascorbic Acid (AA) 0.1 mM/L and treatments V4d and V24d: TCM-199 + DMSO 1.5M + EG 1.5M + SUC 0.5M + AA 0.1mM/L. After being vitrified, fragments were stored in liquid nitrogen for three days. Fragments were then heated in solution of decreasing SUC and fixed for histology. In experiment II, the viability of FOPAs after cooling followed by vitrification by Trypan Blue staining (AT) was studied. Bovine ovaries (n = 10) were collected, fragmented and distributed as described in the first experiment, subsequently submitted to mechanical follicular isolation for analysis of viability. The morphology variable was evaluated by SNK test and viability was analyzed by Chi-square Test at 5% probability or the Fisher Exact Test when the number of repetitions was less than 30 follicles. There was no difference in percentage of morphologically normal follicles between fresh control group and control group cooled for 4 h (99.3% and 96.0% respectively; $P>0.05$), nevertheless, there was reduction of FOPAs morphological integrity of control cooled for 24 h (86%; $P<0.05$). After vitrification, there was reduction ($P<0.05$) of normal

morphology in all treatments when compared with cooled control groups. On the other hand, the viability analysis showed that V4c treatment were not significantly different when compared with control 24h treatment and, together V24c treatment, showed higher capacity of morphological preservation of FOPAs than other treatments ($P < 0.05$), indicating that AA can reduce the toxic and osmotic damages caused by cryopreservation procedure. In conclusion, FOPAs included in the ovarian bovine tissue conserve the morphology efficiently when cooled to 4 °C for 4 hours in TCM-199 + HEPES + Antibiotics and, the association of permeable cryoprotectants DMSO and EG with the antioxidant AA improves survival rates and maintain the morphologic integrity during the vitrification.

1. INTRODUÇÃO

A evolução da produtividade está diretamente associada ao processo tecnológico e científico, resultado do desenvolvimento de várias biotecnologias ligadas à reprodução animal (RENESTO, 2004). Tais biotécnicas, vêm sendo aprimoradas com o intuito de aumentar a eficiência reprodutiva de animais geneticamente superiores, visando otimizar o material genético para obtenção do maior número de descendentes, em um curto período de tempo.

Apesar de todo o avanço alcançado, a produção de embriões a partir de fêmeas de alto valor zootécnico pode ser ainda mais eficiente com a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais – MOIFOPA, especialmente quando se leva em consideração que o ovário dos mamíferos contém milhares de oócitos, sendo a grande maioria inclusa em folículos pré-antrais, e que apenas uma ínfima proporção destes é ovulada. Esta biotécnica visa o resgate de folículos pré-antrais do ambiente ovariano e posterior armazenamento ou cultivo *in vitro* destes folículos até a maturação (FIGUEIREDO et al., 2008), evitando assim, a morte folicular que ocorre naturalmente *in vivo*. Devido à ineficácia dos meios de cultivo em manter a viabilidade e o crescimento folicular *in vitro*, a criopreservação de folículos pré-antrais (FOPAs) pode ser empregada como uma importante ferramenta para a preservação da morfologia e viabilidade folicular em baixas temperaturas até o momento de sua utilização, permitindo a formação de bancos de germoplasma de animais de alto valor zootécnico (SANTOS et al., 2007).

Os FOPAs já isolados ou inclusos no tecido ovariano possuem duas opções de conservação, uma de curto prazo, que é o resfriamento, e outra opção de longo prazo, a criopreservação. O resfriamento possibilita a diminuição do metabolismo dos oócitos, minimizando o gasto de energia e retardando o processo de degeneração (ROY & TREACY, 1993), o que é essencial para preservar a viabilidade dos FOPAs durante o transporte ou o preparo dos procedimentos de rotina no laboratório. A criopreservação pode ser realizada por dois métodos: a congelação lenta e a vitrificação. O processo de vitrificação diferencia da congelação lenta, pois emprega altas concentrações de agentes crioprotetores (ACP), proporcionando viscosidade à solução de vitrificação a um valor suficientemente alto para comportar-se como um sólido amorfo, porém sem cristalização (CHIAN et al., 2004). É considerado um método rápido e relativamente

barato, visto que, não requer equipamento especial como o freezer programável (FAUSTINO et al, 2010). No entanto, é conhecido que todo processo de criopreservação provoca danos à estrutura celular consequente da formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS) que provocam peroxidação lipídica (FREI et al., 1989), o que reforça a necessidade de adicionar substâncias ao meio para minimizar o estresse oxidativo.

Vários trabalhos têm mostrado a utilização da vitrificação para a criopreservação de tecido ovariano em diferentes espécies (Bovinos: BICALHO & LUNA, 2008; LUNA et al., 2008a; KAGAWA et al, 2009; BAO et al. 2010; JIMENEZ, 2010; Camundongos: DELA PEÑA et al., 2002; CHEN et al., 2006; CHOI et al., 2008; Caninos: ISHIJIMA et al., 2006; Suínos: MONIRUZZAMAN et al., 2009; Ovinos: AL-AGHBARI & MENINO, 2002; BORDES et al., 2005; Caprinos: SANTOS et al., 2007 e Humanos: ISACHENKO et al., 2003; RAHIMI et al., 2003). No entanto, apesar de grandes avanços já terem sido relatados, como o nascimento de animais após o enxerto de tecido ovariano previamente vitrificado (DELA PEÑA et al., 2002; AL-AGHBARI & MENINO, 2002; BORDES et al., 2005) na maioria dos estudos, a viabilidade folicular ainda permanece inferior à do tecido fresco, limitando o sucesso da criobiologia. Baseado nisso, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos de criopreservação que mantenham a sobrevivência folicular e a integridade no tecido ovariano.

Objetiva-se no presente trabalho avaliar o efeito do resfriamento e da associação de crioprotetores penetrantes e não penetrante acrescido de ácido ascórbico na qualidade de folículos pré-antrais bovinos vitrificados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ovário dos mamíferos

O ovário, a gônada feminina, desempenha função endócrina (produção e liberação de hormônios esteróides e diversos peptídeos) e função exócrina ou gametogênica (produção e liberação de oócitos), a qual é exercida pela interação entre dois fenômenos que ocorrem no ovário: a oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1991).

O ovário dos mamíferos é bastante heterogêneo e é constituído por duas regiões distintas: uma região mais interna denominada medular, constituída de tecido conjuntivo frouxo, contendo nervos, vasos sanguíneos (muito irrigada) e linfáticos, responsável pela nutrição e sustentação do ovário; e outra região mais externa e funcional do órgão denominada córtex, onde se encontram os folículos pré-antrais, antrais, corpo lúteo e *corpus albicans* (FERREIRA, 2010). De uma forma mais detalhada o córtex ovariano é revestido por um epitélio que contém uma camada única de células cuboidais. Abaixo do epitélio está a túnica albugínea, constituída de tecido conjuntivo, fibroblastos, colágeno e fibras reticulares (SILVA et al, 2004) que é seguida por uma grande massa de folículos pré-formados durante a vida embrionária da fêmea, em diferentes estádios de desenvolvimento (GONZALEZ, 2002) representado na Figura 1.

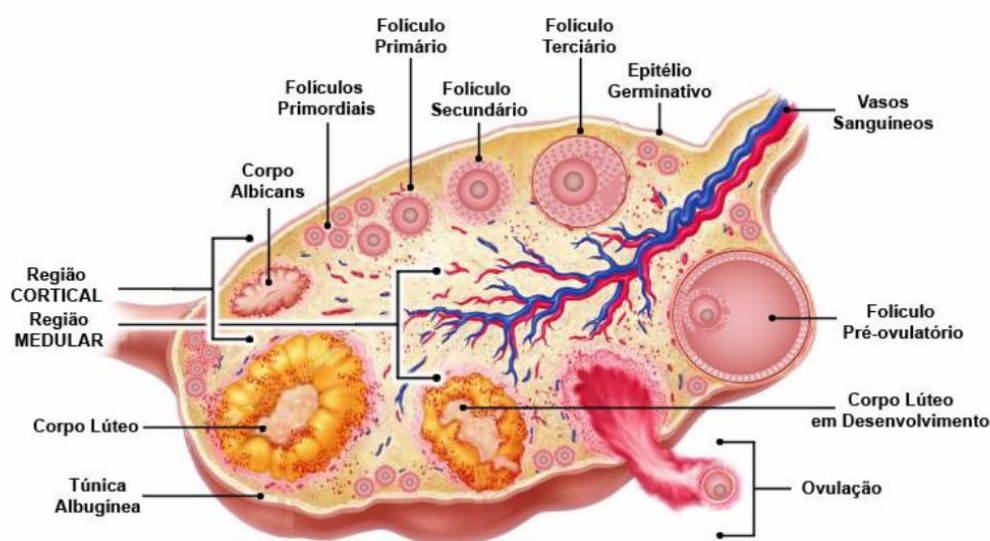


Figura 1. Representação esquemática do ovário mamífero e suas principais estruturas (LIMA, 2012).

2.2 Folículos ovarianos, classificação e caracterização estrutural

O folículo é considerado a unidade morfológica e funcional do ovário mamífero, sendo composto por um oócito circundado por células da granulosa e da teca, cuja função é proporcionar um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito (CORTVRINDT & SMITZ, 2001). Durante a foliculogênese, processo de formação, crescimento e maturação folicular, a morfologia folicular é alterada, visto que o oócito cresce e as células circundantes se diferenciam (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006). Os folículos podem ser classificados de acordo com seu grau de evolução, número de camadas de células da granulosa (CG), desenvolvimento das camadas de células tecais, posição do oócito dentro do *cumulus oophorus* circunjacente e presença do antro (FERREIRA, 2010). Comumente os folículos podem ser divididos em: 1) folículos pré-antrais ou não cavitários, que abrangem os folículos primordiais, transição, primários e secundários e 2) folículos antrais ou cavitários, compreendendo os folículos terciários, de De Graaf ou pré-ovulatório (HULSHOF et al., 1994). Os folículos primordiais contêm um oócito circundado por uma única camada de células com morfologia pavimentosa (FORTUNE, 2003). Estão localizados na região da periferia do córtex do ovário e correspondem a 95% de toda a população folicular presente no ovário (FIGUEIREDO et al., 2008). Durante a vida fetal, a formação dos folículos primordiais em ovários bovinos é observada aos 120 dias (RÜSSE, 1983). Segundo Munhoz e Silva (2008), o folículo primordial bovino possui em média 5,5 CG, diâmetro folicular de 36,5 μm e um diâmetro do oócito de 29,1 μm . Após a formação dos folículos primordiais, alguns podem ser estimulados a crescer imediatamente ou, na maioria destes, as células da pré-granulosa param de se multiplicar e entram num período de quiescência até receberem sinais para entrar no *pool* de crescimento (McGEE & HSUEH, 2000).

A transição do estágio primordial para primário pode ser prolongada e folículos com CG de morfologia pavimentosa e cúbica são frequentemente observados, sendo classificados por alguns autores como folículos de transição (FORTUNE, 2003). Quando o oócito é circundado por uma camada completa de CG de morfologia cúbica, os folículos passam a ser denominados primários (GOUGEON & BUSSO, 2000). Durante o crescimento destes folículos, as CG sofrem proliferação e há aumento do oócito em tamanho e conteúdo protéico (PICTON et al., 1998). Em bovinos, o

aparecimento de folículos primários, em fetos, ocorre aos 140 dias de gestação (RÜSSE, 1983) e possuem 41,3µm de diâmetro, o oócito 34,8µm de diâmetro, e em média, o número de CG é 12,9 (MUNHOZ & SILVA, 2008).

Os folículos secundários são formados quando duas ou mais camadas de CG se desenvolvem e as células da teca podem ser evidenciadas do estroma circundante, e com o desenvolvimento desses folículos inicia-se a formação da zona pelúcida (LUCCI et al., 2001). Além disso, as CG apresentam uma extensa rede de junções do tipo gap, que são canais entre membranas que permitem a passagem de nutrientes, íons inorgânicos, mensageiros e pequenos metabólitos entre as células (KIDDER & MHAWI, 2002). O núcleo do oócito assume uma posição excêntrica e as organelas começam a mover-se para a periferia (LUCCI et al., 2001). Os folículos secundários são observados em ovários de fetos bovinos aos 210 dias de gestação (ERICKSON, 1966) e possuem um diâmetro de 81 µm e 49,5 µm de diâmetro oócitario (FORTUNE, 2003).

Com o crescimento dos folículos secundários e organização das CG em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro. A partir deste estágio, os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais. A formação dos folículos antrais em bovinos é observada aos 230 dias de gestação (RÜSSE, 1983) e o diâmetro atinge entre 130 e 250 µm (FORTUNE, 2003). O fluido antral pode servir como uma importante fonte de substâncias reguladoras derivadas do sangue ou secreções das células foliculares, gonadotrofinas, esteróides, fatores de crescimento, enzimas, proteoglicanas e lipoproteínas. Durante o desenvolvimento folicular, a produção de fluido antral é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos, os quais estão fortemente relacionados com o aumento do folículo antral (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado por uma fase de crescimento, recrutamento, seleção e dominância, sendo a formação de folículos pré-ovulatórios (último estágio de desenvolvimento folicular) um pré-requisito para a ovulação e formação do corpo lúteo, bem como manutenção da fertilidade (DRUMMOND, 2006). O folículo pré-ovulatório é caracterizado por um oócito circundado por CG especializadas que são denominadas de células do cumulus. As CG de folículos pré-ovulatórios param de se multiplicar em resposta ao LH e iniciam o processo final de diferenciação. A ovulação ocorre em resposta ao pico de LH. Em todas as espécies, a formação de folículos pré-ovulatórios ocorre geralmente durante a puberdade (DRIANCOURT, 2001).

2.3 População e atresia folicular

O estoque finito e não renovável dos oócitos ou células germinativas é considerado como uma premissa básica da fisiologia da reprodução. O declínio progressivo do número de oócitos ao longo da vida pós-natal ocorre principalmente por mecanismos apoptóticos, e na senilidade, a ausência de células germinativas nos ovários apresenta-se como fenômeno amplamente aceito (SENEDA & BORDIGNON, 2007).

Em muitos mamíferos, a população folicular ovariana é estabelecida ainda na vida intra-uterina (primatas e ruminantes: KNIGHT & GLISTER, 2006) ou em um curto período de tempo após o nascimento (roedores: OJEDA et al., 2000). Os folículos pré-antrais representam 90% da população folicular e constituem o estoque definitivo dos gametas femininos. No entanto, alguns estudos têm sugerido a formação de novas células germinativas em mulheres (BUKOVSKY et al., 2004) e camundongas adultas (JOHNSON et al., 2005). Independente disso, a população folicular ovariana difere entre as espécies, além de ser observada uma forte variação individual. O número de folículos pré-antrais por ovário varia entre as espécies, sendo de aproximadamente 1.500 em camundongas (SHAW et al., 2000a), 33.000 em ovelhas (AMORIM et al., 2000), 35.000 em cabras (LUCCI et al., 1999), 2.000.000 em mulheres (ERICKSON, 1986) e 235.000 em vacas (BETTERIDGE et al., 1989).

Em bovinos, o número de folículos que uma fêmea irá dispor já é determinado antes do nascimento. Aos 110 dias de gestação, o número médio de folículos nos ovários de um feto é de, aproximadamente 2,7 milhões, decrescendo até o nascimento para cerca de 130.000 folículos pré-antrais (ERICKSON, 1986). Segundo Webb e Campbell (2008), a bezerra nasce com um total de 100.000 a 250.000 folículos primordiais nos ovários, reservas que declinam com a idade, caindo para cerca de 3.000 entre 15-20 anos de idade (ERICKSON, 1966; WEBB & ARMSTRONG, 1998). Já para Hanzen et al. (2000), na vaca, o estoque é de \pm 235.000 e depende da raça, idade, nível hormonal e condição reprodutiva, com a redução para 40.000 entre dois e três anos e 2.500 aos 12-14 anos. A tabela 1 mostra o número de folículos primordiais nos ovários de bovinos em função da idade do animal.

Tabela 1. Número de folículos primordiais nos ovários de bovinos em função da idade do animal.

IDADE DO ANIMAL	FOLÍCULOS PRIMORDIAIS (N)
Nascimento	150.000 – 235.000
Três meses	75.000 - 100.000
Dois a quatro anos	20.000 - 70.000
Quinze a vinte anos	2.500 – 3.000

(Fonte: FERREIRA, 2010)

Apesar desta grande população folicular presente no ovário, a maioria destes (cerca de 99,9%) não chega à ovulação, morrendo por um processo denominado atresia, o qual pode ocorrer por via degenerativa (SAUMANDE, 1991) e/ou apoptótica (HUSSEIN, 2005). A degeneração pode ser observada quando ocorrem alterações no fornecimento de oxigênio e nutrientes para o ovário. Nesta situação, a isquemia pode ser uma das principais causas do desencadeamento da morte folicular (FARBER, 1982), resultando em alterações na permeabilidade da membrana celular. Essas alterações podem levar ao aumento de água intracelular e do volume das células, vacuolização citoplasmática e, conseqüentemente, degeneração (BARROS et al., 2001). Já a apoptose é um processo de morte celular individual e ativo, caracterizado pela fragmentação nuclear e pela formação de corpos apoptóticos (RACHID et al., 2000).

Segundo Hirshfield (1989), um folículo atrésico pode ser identificado pela presença de picnose e/ou apoptose das células da granulosa e/ou alterações degenerativas do oócito. A atresia reduz de maneira significativa o número de oócitos potencialmente ovuláveis, reduzindo, conseqüentemente, os oócitos viáveis durante a vida reprodutiva de um animal (FIGUEIREDO et al., 2002). A progressão da apoptose em folículos ovarianos é dependente de uma regulação cooperativa de diferentes fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, e é possível que nenhum desses fatores, isoladamente, seja essencial para o controle do crescimento folicular ou atresia. É mais provável que o balanço entre os fatores que promovem a sobrevivência e aqueles que induzem a apoptose estabeleça se um determinado folículo continuará o seu desenvolvimento ou sofrerá atresia (HSU & HSUEH, 2000).

Em mulheres também pode ocorrer a perda folicular em decorrência de fatores externos como tratamentos de radio e/ou quimioterapia. A ionização ocasionada pela

radiação resulta em efeitos adversos nos ovários, em todas as fases do desenvolvimento folicular, sobretudo em folículos primordiais. As altas doses de radioterapia utilizadas em tratamentos contra o câncer podem resultar em falência ovariana prematura e depleção da reserva de folículos primordiais, ocasionando esterilidade. Quanto à quimioterapia, todas as drogas quimioterápicas atuam interrompendo processos celulares vitais e cessando ciclo de proliferação celular normal (MALTARIS et al., 2009).

2.4 Conservação de folículos pré-antrais

Para evitar a perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo*, seja por atresia ou apoptose, vem sendo desenvolvida a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-antrais, a MOIFOPA, que visa recuperar os folículos pré-antrais do ambiente ovariano e posteriormente conservá-los por longos períodos de tempo, pelas técnicas de criopreservação, até o momento que possam ser cultivados *in vitro* até a completa maturação (FIGUEIREDO et al., 2008). Os folículos pré-antrais já isolados ou inclusos no tecido ovariano possuem duas opções de períodos de conservação, uma de curto prazo, que é o resfriamento, e outra opção de longo prazo, que se trata da criopreservação.

2.4.1 Resfriamento

O resfriamento causa a redução da temperatura tecidual, a qual proporcionará ao tecido uma diminuição do metabolismo celular reduzindo, conseqüentemente, o consumo de energia, retardando o processo de degeneração. Por isso, o resfriamento é utilizado principalmente para viabilizar o transporte dos folículos ovarianos de locais distantes dos laboratórios, sendo fundamental o desenvolvimento de protocolos adequados, que permitam a manutenção da sobrevivência folicular por maior tempo sem alterar a função dos folículos. Geralmente, animais de alto valor genético encontram-se em locais distantes de laboratórios especializados, e quando há necessidade da coleta de material germinativo deste animal faz-se necessário um protocolo adequado para o transporte, de forma que minimize os danos durante o transporte (PLACIDO, 2009).

O transporte dos ovários pode ser realizado em meios de composição simples, como o soro fisiológico ou solução tampão (LUNA & MUNHOZ, 2008b), solução

salina 0,9% (LUCCI et al., 2004b) ou soluções ricas em nutrientes, como o TCM-199 (COSTA et al., 2005). O meio TCM-199 tem sido largamente empregado com sucesso no cultivo *in vitro* de embriões, oócitos oriundos de folículos antrais e pré-antrais, bem como na conservação de folículos pré-antrais caprinos, ovinos e bovinos (CELESTINO et al., 2007). A qualidade dos folículos recuperados destes ovários depende então do meio utilizado, da temperatura empregada e do tempo gasto. Em geral o resfriamento ovariano é feito a 4 °C ou 20 °C, para que haja a manutenção da estrutura morfológica normal do folículo. Essas temperaturas foram usadas para conservação de folículos pré-antrais de bovinos (CELESTINO et al., 2007), ovinos (ANDRADE et al., 2001), caprinos (CARVALHO et al., 2001) e suínos (LUCCI et al., 2007).

2.4.2 Criopreservação

Criopreservar células germinativas femininas tem como finalidade manter a viabilidade reprodutiva de fêmeas por longos períodos de tempo. Segundo Borges (2009b), é possível criopreservar oócitos maduros, imaturos puncionados de folículos antrais ou imaturos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (isolados ou em fragmentos de tecido ovariano). Os oócitos imaturos presentes no interior dos folículos pré-antrais parecem ser mais resistentes ao processo de criopreservação que oócitos maduros, por diversas características, das quais, pode-se destacar: a) o pequeno tamanho do oócito; b) baixa taxa metabólica; c) estágio do ciclo celular (prófase I); d) pequeno número de células de suporte; e) ausência de zona pelúcida; f) ausência de grânulos corticais e g) pequena quantidade de lipídios intracitoplasmáticos (SHAW et al., 2000a; KAGAWA et al., 2009).

A criopreservação é uma importante ferramenta para a formação de bancos de germoplasmas, permitindo: a) o melhoramento animal, onde um grande número de características genéticas seja confrontado ao longo do tempo; b) exportação e importação de espécies e raças de interesse zootécnico ou zoológico (REICHENBACH et al., 2002); c) facilitação na permuta mundial de germoplasma, programas de pesquisas e preservação de espécies em extinção (GUNASENA et al., 1997; HAFEZ, 2004); d) preservação de fertilidade e função endócrina em mulheres de idade avançada ou que serão submetidas ao tratamento de câncer com medicações tóxicas às gônadas, por meio da conservação prévia de tecido ovariano (LEE et al., 2001).

2.4.2.1 Princípios básicos da Criopreservação

A criopreservação consiste na conservação de material biológico a temperaturas ultra-baixas, pela exposição desse material ao vapor de nitrogênio líquido (aproximadamente -150°C) ou, mais comumente, mergulhando-o no próprio nitrogênio líquido (-196°C ; MAZUR, 1980). Os únicos estados físicos existentes abaixo de aproximadamente -130°C são o estado cristalino ou o estado vítreo e, em ambos, a viscosidade é muito elevada, a difusão é considerada insignificante (dependendo do tempo de armazenamento), a energia cinética molecular é muito baixa e reações metabólicas impulsionadas por energia térmica ocorrerão muito lentamente ou serão paralisadas completamente (KARTHA, 1985). Portanto, a temperatura do nitrogênio líquido, pode manter a viabilidade das células e o armazenamento pode ser estendido por muitos anos sem alterar a estabilidade genética (STUSHNOFF & SEUFFERHELD, 1995). Entretanto, para que isso seja possível mesmo após longos períodos de conservação, alguns fatores essenciais para a sobrevivência das células devem ser levados em consideração, tais como escolha do tipo e da concentração de agentes crioprotetores, taxa de redução da temperatura de congelamento, manutenção da temperatura de estocagem, escolha do procedimento de descongelamento e técnicas utilizadas para assegurar a remoção do crioprotetor (GORDON, 1994).

2.4.2.2 Agentes crioprotetores

Agentes crioprotetores são solventes orgânicos utilizados individualmente ou em associação que atuam protegendo a célula ou o tecido contra desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema da temperatura (GUYADER-JOLY, 1998; SANTOS et al., 2008), além disso, podem moderar os efeitos letais da concentração de soluto extracelular, gelo intracelular e gelo na matriz dos tecidos (ELMOAZZEN et al., 2005).

Os agentes crioprotetores podem ser álcoois, açúcares, amido e grandes polímeros, que podem atuar por diferentes mecanismos (FULLER & PAYNTER, 2004; ACKER, 2007), e de acordo com o tamanho da molécula podem ser classificados como penetrantes ou não penetrantes. Dentre os crioprotetores penetrantes mais empregados para a criopreservação de embriões, oócitos e tecido ovariano estão o glicerol (GLY), dimetilsulfóxido (DMSO), propanodiol (PROH) e etilenoglicol (EG) (Wanderley,

2010), porém, no que diz respeito aos crioprotetores não penetrantes tem-se açúcares como galactose, glicose, sacarose, trealose, e macromoléculas tais como, polivinilpirrolidona, álcool polivinílico, hialuronato de sódio, albumina sérica bovina e Ficoll 70 (BORGES, 2009a).

Os crioprotetores penetrantes são substâncias que possuem baixo peso molecular e agem por meio de diferentes mecanismos, como: (1) interação na dinâmica dos microfilamentos e microtúbulos celulares (DOBRINSKY, 1996); (2) redução do ponto de congelamento da solução; (3) aumento da viscosidade do meio; (4) redução da concentração de eletrólitos intra e extracelulares durante a criopreservação (Santos et al., 2008); (5) substituição parcial das moléculas de água das células (RALL et al., 1984) e (6) ligação ao hidrogênio da água presente no meio intracelular (JAIN & PAULSON, 2006). Cada crioprotetor tem mecanismos próprios de ação, porém, seus efeitos são, geralmente, estabilizar membranas celulares, produzir desidratação parcial das células e diminuir o ponto de fusão do sistema (CABODEVILA & TERUEL, 2001; PICTON et al., 2000). Os crioprotetores penetrantes possuem diferentes pesos moleculares GLY=92,09 KDa, EG=62,07 KDa, PROH=76,09 KDa, DMSO=78,13 KDa e devido a essas diferenças são observadas diferentes velocidades de penetração nas células. Por exemplo, o baixo peso molecular do EG em relação ao DMSO, GLY e PROH, possibilita maior penetração nas células durante curto período de exposição, prevenindo a ocorrência de injúrias celulares de origens tóxica e osmótica (SHAW et al., 2000a). Na criopreservação do tecido ovariano, os estudos sugerem que o DMSO e EG são os crioprotetores que causam menos danos aos oócitos e folículos pré-antrais em bovinos (LUCCI et al., 2004a, CELESTINO et al., 2008) em função de sua fácil permeabilidade no tecido.

No que se refere aos crioprotetores não penetrantes, estes são moléculas com grandes dimensões que não penetram na membrana celular (HOVATTA, 2005), porém, a protegem por intermédio da sua ligação às cabeças dos grupos fosfolipídicos membranários (SANTOS et al., 2008). Além disso, agem reduzindo o choque osmótico, controlando a entrada de água na célula (SHAW et al., 2000b) levando à desidratação celular antes de congelamento. A sacarose é utilizada com frequência e age como um tampão osmótico contra o estresse causado durante a adição e remoção do crioprotetor penetrante (MANDELBAUM et al., 1988), entretanto, seu uso ainda é discutido na literatura. Cortes e Rodrigues (2000) observaram em embriões de camundongo vitrificados com a adição de 0,3 M de sacarose na solução de EG, que não foram

alteradas as taxas de sobrevivência dos embriões quando comparado ao grupo sem adição de sacarose. Em murinos, a sacarose foi utilizada como crioprotetor extracelular para folículos pré-antrais com sucesso, especialmente quando combinada com EG (SALEHNIA, 2002). Com relação à oócitos humanos, Chen et al. (2004) utilizaram o crioprotetor PROH adicionado de sacarose 0,1 M e observaram uma taxa de 75% de sobrevivência folicular, Bianchi et al., (2005) relataram uma alta taxa de sobrevivência de 83% quando sacarose a 0,3 M foi adicionada ao mesmo crioprotetor. Em bovinos, Bicalho e Luna (2008) avaliaram a viabilidade de folículos pré-antrais usando o crioprotetor EG com ou sem sacarose após o processo de vitrificação e concluíram que a sacarose não confere proteção aos folículos e sugeriram ainda que seu uso seja desnecessário no processo de criopreservação. Bao et al., (2010) relataram normalidade na morfologia de folículos secundários vitrificados em soluções de sacarose em relação aos vitrificados sem sacarose que se apresentavam com retração oócitaria e citoplasma anormal, enquanto folículos primordiais vitrificados sem sacarose mantiveram sua morfologia.

2.4.2.3 Métodos de congelamento

O processo de criopreservação de células e/ou tecidos, em geral, pode ser realizado por dois métodos: congelamento lento, também denominado convencional, e vitrificação. No congelamento lento, a redução da temperatura ocorre de maneira gradual controlada por um freezer programável (NAIK et al., 2005), utilizando baixas concentrações de crioprotetores (PAYNTER et al., 1999) geralmente 1,5 M (PAYNTER, 2000), por um período que pode variar de 20 (RODRIGUES et al., 2004) a 60 min. (CANDY et al., 1997). Nesse método, o material é resfriado lentamente a uma taxa de 2 °C/min. até -4 a -9 °C, mantendo-se nessa temperatura por um curto período (10 a 15 minutos) para a estabilização térmica e realização do *seeding*, o qual previne o super-resfriamento e a extrema desidratação celular (OKTAY et al., 2001). Em seguida, a amostra passa a ser resfriada a taxas ainda mais baixas, geralmente -0,3 °C/min e, visto que a desidratação celular é suficientemente atingida (entre -30 a -80 °C), o material é imerso e estocado em nitrogênio líquido (-196 °C). Após a estocagem, deve ser realizada o descongelamento das amostras, seguida da remoção do agente crioprotetor, por uma ou sucessivas lavagens (SANTOS et al., 2008) do material biológico.

Diferentemente do congelamento lento, a vitrificação envolve a exposição do material biológico a altas concentrações de agente crioprotetor (geralmente entre quatro e seis molares) por um curto período de tempo (25 segundos a cinco minutos), à temperatura ambiente. Como consequência, a água passa do estado líquido para um estado vítreo, considerado um sólido amorfo, sem exposição ao estágio cristalino (RALL & FAHY, 1985), ou seja, não se observa a formação de cristais de gelo (YEOMAN et al., 2005; Figura 2).

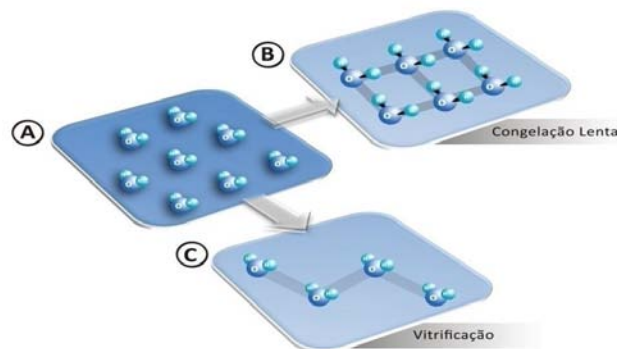


Figura 2. Representação esquemática da organização molecular em estado líquido (A), estado sólido formado na congelamento lento (B), e estado vítreo caracterizado por um sólido amorfo formado no processo de vitrificação (C) (CARVALHO, 2010).

Em estado líquido, as moléculas de água possuem maior movimentação por se encontrarem unidas por ligações fracas (pontes de hidrogênio). Durante a realização do procedimento do congelamento lento, forma-se um estado cristalino caracterizado por um sólido organizado, no qual as moléculas estão unidas por um maior número de ligações e estas se dispõem de forma fixa e hexagonal, resultando em um afastamento das moléculas e formação de cristais. Já no processo de vitrificação, observa-se um estado de não-equilíbrio, conhecido como estado vítreo, caracterizado por um sólido amorfo em que parte das cadeias moleculares encontra-se desorganizada, permitindo certa flexibilidade entre as moléculas (CARVALHO, 2010).

O processo de vitrificação foi rapidamente adotado como um método prático alternativo ao congelamento de espermatozoides, oócitos e embriões usados na medicina reprodutiva humana e em animais de produção devido à simplicidade na sua execução, rentabilidade econômica e velocidade do procedimento de preservação

(VAJTA et al., 1998). Atualmente, vários trabalhos também têm mostrado a utilização desse método para a criopreservação de tecido ovariano considerando a redução do tamanho dos fragmentos (o que favorece a entrada e difusão do soluto); redução do tempo de exposição aos crioprotetores; usando os crioprotetores mais adequados à espécie; diminuição do volume da solução a ser vitrificada; e aumento da velocidade de vitrificação (DELA PEÑA et al., 2002; ISACHENKO et al., 2003; LUCCI et al., 2004b; CHOI et al., 2008; LUNA et al., 2008a; BICALHO & LUNA, 2008; SILVA & LUNA, 2009; MONIRUZZAMAN et al., 2009; BAO, 2010). Obtendo resultados satisfatórios como o nascimento de animais após o enxerto de tecido ovariano previamente vitrificado (DELA PEÑA et al., 2002; AL-AGHBARI & MENINO, 2002; BORDES et al., 2005).

2.5 Estresse oxidativo e o Ácido Ascórbico

No processo de criopreservação do ovário podem ocorrer danos celulares em qualquer momento, que podem ocasionar estresse osmótico na célula. Durante o tempo de exposição e equilíbrio tecidual com a solução de crioprotetor, os principais prejuízos ocasionados são danos tóxicos e osmóticos (VAJTA, 2000). No entanto, é possível que a inclusão de uma substância antioxidante como o ácido ascórbico na solução de vitrificação para a criopreservação de folículos pré-antrais diminuíssem esses danos, reduzindo os efeitos das espécies reativas de oxigênio (ROS).

O metabolismo oxidativo é essencial para produção de energia celular que regula os processos fisiológicos, entretanto, está inevitavelmente associado com a geração de espécies reativas ao oxigênio. O processo de geração de ROS é um componente chave de processos como inflamação, isquemia, envelhecimento e carcinogêneses. Além disso, o desbalanço entre oxidante e antioxidante favorece a formação de peróxidos causando estresse oxidativo e consequentemente sequelas patológicas (OCHSENDORF, 1999). Os processos atuais de criopreservação envolvem diferentes etapas que no seu transcorrer levam a produção de ROS, dentre estes destacam-se o radical livre superóxido e peróxido de hidrogênio. De acordo com Mignotte e Vayssiere (1998), o acúmulo dessas substâncias pode gerar necrose em decorrência da peroxidação lipídica em diversas biomoléculas, ou, até mesmo, danos no DNA. Além disso, podem causar a oxidação de moléculas chaves, liberando proteases, lípases e nucleases dentro das mitocôndrias, culminando com a morte celular (FIERS et al., 1999). A proteção contra

os ROS pode ser fornecida por degradação enzimática (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase), remoção pelos antioxidantes, e reparação molecular. O mecanismo de ação dos antioxidantes é bem variado, desde a remoção do oxigênio do meio, varredura dos ROS, sequestro de metais catalizadores da formação de radicais livres, aumento da geração de antioxidantes endógenos ou mesmo a interação de mais de um mecanismo podendo ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos conforme a estrutura do agente antioxidante (TUCKER & TOWNSEND, 2005).

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel não enzimática, classificado como antioxidante. É utilizado para transformar os ROS em formas inertes, além de ser uma molécula usada na hidroxilação de várias outras reações bioquímicas nas células (SEBRELL & HARRIS, 1967). Tal substância encontra-se em todos os tecidos animais e está presente principalmente nas glândulas hipofisárias e adrenais, bem como nas gônadas (LUCK et al., 1995). No ovário, o ácido ascórbico é encontrado nas células da granulosa, células da teca interna, células luteínicas e no oócito (THOMAS et al., 2001). As propriedades antioxidantes do ácido ascórbico são atribuídas a sua capacidade de reduzir danos causados pelos ROS pela formação do ascorbato, um radical livre estável (BUETTNER, 1993). Este mecanismo desempenha inúmeras funções de proteção à célula que incluem a prevenção de mutações no DNA (LUTSENKO et al., 2002), a proteção contra a peroxidação lipídica (BARJA et al., 1994; Kimura et al., 1992) e a reparação de aminoácidos oxidados para manutenção da integridade de proteínas (BARJA et al., 1994; CADENAS et al., 1998), a produção de hormônios esteróides (TSUJI et al., 1989) e inibição da apoptose em células da granulosa em bovinos (TILLY & TILLY, 1995) e em complexos cumulus-oócito de camundongas (EPPIG et al., 2000; MURRAY et al., 2001).

2.6 Métodos de avaliação de FOPAs resfriados e vitrificados

Após o período de resfriamento e vitrificação, é necessário avaliar e analisar o grau de comprometimento da morfologia e viabilidade do tecido ovariano. Pela técnica de Histologia Clássica (HC), pode-se verificar sinais avançados de atresia, como a picnose nuclear, danos citoplasmáticos, destacamento das células da granulosa e danos na membrana basal (DEMIRCI et al., 2002). Além de permitir a classificação dos folículos quanto ao seu estágio de desenvolvimento (primordial, transição, primário ou

secundário; LIMA, 2012). Contudo, a morfologia folicular nem sempre está correlacionada com a integridade ultraestrutural das organelas celulares, as quais podem ser avaliadas via Microscopia Eletrônica de Transmissão (SANTOS et al., 2006a) ou Microscopia Confocal (DE SANTIS et al., 2007).

Para detectar a viabilidade dos folículos após isolamento do tecido ovariano, têm sido utilizados corantes vitais como o Azul de Trypan (PINTO et al., 2008) e marcadores fluorescentes como a Calceína-AM e Etídio-Homodímero-1 (AERTS et al., 2008). O Azul de Trypan avalia a integridade da membrana celular. Nos folículos não viáveis, com membranas danificadas, ocorre penetração do corante, que pode ser visualizada em microscópio invertido (JEWGENOW et al., 1998), folículos não corados são considerados viáveis.

Logo após a criopreservação podem ocorrer alterações moleculares que se manifestam com a retomada do metabolismo e desenvolvimento folicular (SIEBZEHRÜBL et al., 2000). Para evidenciar estas possíveis alterações, diversos estudos têm destacado o cultivo *in vitro* como uma ferramenta valiosa para verificar a qualidade folicular (CECCONI et al 2004; TSURIBE et al, 2009; BORGES et al 2009; FAUSTINO et al, 2010). Outros pesquisadores têm usado o transplante do tecido ovariano para a retoma da função ovariana (SALLE et al., 2003; ARAV et al., 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de execução do trabalho

O presente estudo foi realizado de Setembro a Outubro de 2011, no Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, no município de Viçosa, região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, Brasil.

3.2 Protocolo experimental

3.2.1 Experimento I: Morfologia de folículos ovarianos pré-antrais bovinos, resfriados a 4 °C por quatro e 24 horas e vitrificados em solução de DMSO e EG acrescidos ou não de SAC e/ou AA.

Foram utilizados ovários (n=10) coletados de cinco novilhas mestiças com 14 a 16 meses de idade (pré-púberes), recém abatidas no Departamento de Zootecnia. Após a coleta, os ovários foram lavados em álcool 70% e em seguida, duas vezes em Meio-Transporte (MT) contendo o meio TCM-199 acrescido de HEPES (solução tampão) e antibióticos (100 mg/L de penicilina e 100 mg/L de estreptomicina). Imediatamente no laboratório, 22 fragmentos foram retirados da região cortical de cada par de ovários com aproximadamente 9 mm³, empregando lâminas de bisturi em condições estéreis (Figura 3). Posteriormente, dois fragmentos foram fixados em solução Carnoy por quatro horas para o processamento histológico (controle fresco; CF) e os 20 fragmentos restantes foram depositados em tubos de Falcon de 50 mL contendo 20 mL de MT e colocados em caixa de isopor com água e gelo para o resfriamento dos fragmentos a 4 °C por dois períodos, quatro e 24 horas.



Figura 3. Fragmentos do tecido ovariano bovino.

Dos 20 fragmentos resfriados, quatro foram fixados constituindo o controle resfriado após quatro e 24 horas (dois fragmentos cada; C4h, C24h) e os 16 restantes foram distribuídos em quatro tratamentos de vitrificação, dois para cada tempo de resfriamento, respectivamente (Tabela 2; Figura 5).

Tabela 2. Tratamentos de vitrificação de fragmentos ovarianos bovinos contendo folículos pré-antrais resfriados por quatro e 24 horas.

TRATAMENTOS		SOLUÇÃO DE VITRIFICAÇÃO
4h	24h	
V4a	V24a	: TCM-199 + DMSO 1,5 M + EG 1,5 M
V4b	V24b	: TCM-199 + DMSO 1,5 M + EG 1,5 M + SAC 0,5 M
V4c	V24c	: TCM-199 + DMSO 1,5 M + EG 1,5 M + AA 0,1 mM/L
V4d	V24d	: TCM-199 + DMSO 1,5 M + EG 1,5 M + SAC 0,5 M + AA 0,1 mM/L

V4: Vitrificação de fragmentos resfriados por 4 horas; V24: vitrificação de fragmentos resfriados por 24 horas; TCM-199: Meio de cultivo de tecido-199; DMSO: Dimetilsulfóxido; EG: Etilenoglicol; SAC: Sacarose; AA: Ácido Ascórbico.

3.2.1.1 Vitrificação dos FOPAs bovinos *in situ*

Para vitrificação, os fragmentos de tecido ovariano foram expostos às soluções por um período de equilíbrio de cinco minutos à temperatura ambiente, posteriormente colocados em criotubos (tampa com rosca externa, volume de 2 mL de fundo cônico; JIMENEZ, 2010) e imediatamente imersos em nitrogênio líquido (-196 °C; Figura 4) onde permaneceram por três dias.

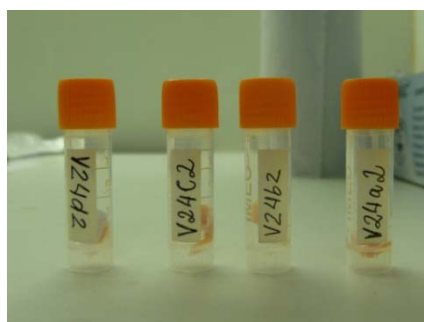


Figura 4. Criotubos para vitrificação de FOPAs bovinos inclusos no tecido ovariano.

3.2.1.2 Aquecimento e remoção dos crioprotetores

No aquecimento, os criotubos foram expostos por um minuto à temperatura ambiente e imersos em água previamente aquecida em banho-maria a 37 °C. Em seguida, os fragmentos foram distribuídos para remoção total dos crioprotetores no meio TCM-199 acrescidos de concentrações decrescentes de SAC (0,5 M; 0,25 M; e 0 M), sendo realizadas duas lavagens em cada meio. Após as lavagens, os fragmentos foram fixados em solução Carnoy para análise morfológica por meio da Histológica Clássica.

3.2.1.3 Análise morfológica

Após as quatro horas de fixação, os fragmentos de tecido ovariano foram desidratados em soluções alcoólicas crescentes (70%, 80%, 90%) e em seguida em três banhos de álcool absoluto, permanecendo uma hora em cada. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em três banhos de xilol e embebidos em parafina. Finalmente os fragmentos incluídos em blocos de parafina foram seccionados seriadamente com espessura de 5µm. Cada 6ª secção foi montada em lâmina e corada pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS)-hematoxilina (CARVALHO, 2010). As lâminas foram examinadas no microscópio óptico em aumento de 40x e contados 30 folículos pré-antrais por cada lâmina com cinco repetições (150 FOPAs por tratamento) (LIMA, 2012).

3.2.1.4 Classificação de folículos pré-antrais

De acordo com o estágio de desenvolvimento os folículos pré-antrais foram classificados como: 1) Primordiais (uma camada de célula da granulosa pavimentosa ao redor do oócito); 2) Transição (uma camada de células da granulosa pavimentosas e cúbicas); 3) Primário (uma camada de células da granulosa cúbicas) e 4) Secundário (duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas ao redor do oócito) (FIGUEIREDO et al., 2003).

Estes folículos foram ainda classificados morfológicamente em normais ou degenerados, sendo considerados normais aqueles folículos que apresentaram oócito intacto circundado por células da granulosa bem organizadas em uma ou mais camadas e sem núcleo picnótico ou degenerados em Grau 1 (folículos apresentando o oócito

degenerado) e folículos degenerados em Grau 2 (folículos apresentando o oócito e células da granulosa degenerados).

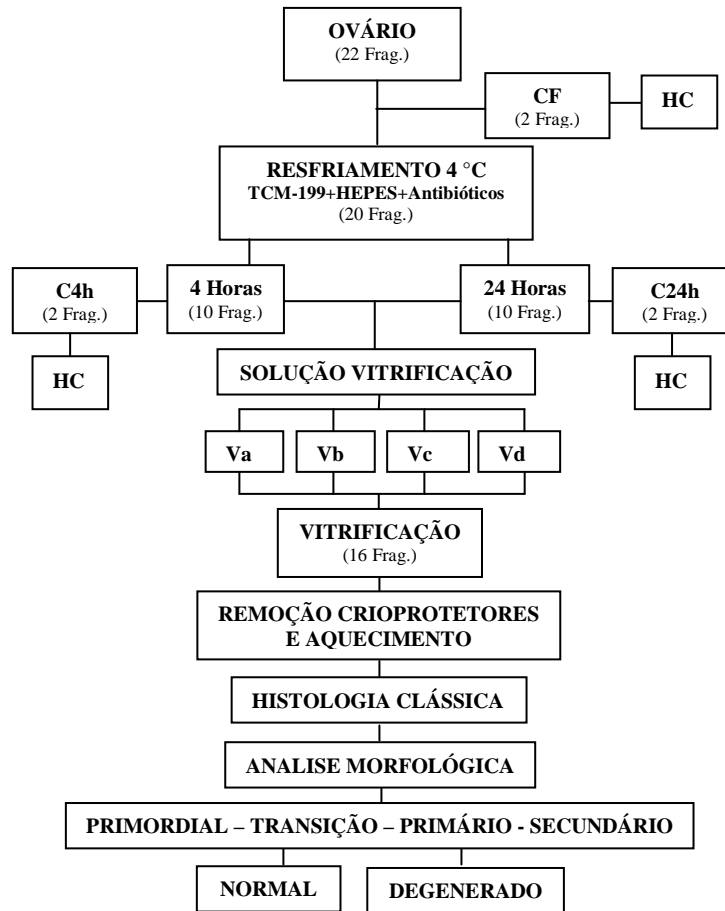


Figura 5. Representação esquemática da análise morfológica de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano bovino.

Frag.: Fragmentos; HC: Histologia Clássica; CF: Controle fresco; C4h: Controle de fragmentos resfriados por 4 horas; C24h: Controle de fragmentos resfriados por 24 horas; Va; Vb; Vc; Vd: Solução de vitrificação a, b, c, d, respectivamente.

3.2.2 Experimento II: Viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais bovinos, resfriados a 4 °C por quatro e 24 horas e vitrificados em solução de DMSO e EG acrescidos ou não de SAC e/ou AA.

Para uma melhor avaliação dos folículos pré-antrais bovinos, foi realizada uma análise de viabilidade por meio da coloração Azul de Trypan (AT). Ovários bovinos (n=10) adicionais foram coletados de cinco novilhas de 14 a 16 meses de idade (pré-púberes), recém-abatidas no Departamento de Zootecnia da UFV, em seguida, no laboratório, os ovários foram fatiados e fragmentados obtendo-se 22 fragmentos de cada par de ovários, assim distribuídos: dois para controle fresco imediatamente processados por isolamento mecânico (zero hora) e 20 fragmentos resfriados em MT a 4 °C nos períodos de quatro e 24 horas e posteriormente vitrificados como foi descrito no experimento I e após aquecimento foram imediatamente submetidos ao isolamento folicular para análise da viabilidade (Figura 6).

3.2.2.1 Análise da viabilidade folicular

Os folículos pré-antrais provenientes dos controles resfriados (quatro e 24 horas) e dos fragmentos vitrificados após aquecimento e remoção dos crioprotetores, foram seccionados em fragmentos pequenos e uniformes, empregando lâminas de bisturi, os cortes foram realizados nos eixos longitudinais, transversais e oblíquos, da região externa para a interna do córtex ovariano (FIGUEIREDO et al., 2002), após este seccionamento foram colocados em meio TCM-199 adicionado de 10% de Albumina Sérica Bovina (BSA). Em seguida, as soluções de fragmentos foram suspensas por repetidos movimentos de sucção (40x) com pipeta de Pasteur de 1000 µm e 600 µm de diâmetro. Posteriormente, foi realizada a filtração sucessiva da suspensão, duas vezes em malha de nylon de 100 µm. Em seguida, foi analisada a viabilidade dos folículos pré-antrais por meio da coloração de AT, adicionando 5 µL de 0,4% de AT a cada 100 µL de solução e incubados por 1 minuto à temperatura ambiente. Após, os folículos foram examinados para avaliar a integridade da membrana celular via penetração do corante (AMORIM et al., 2003), usando um microscópio invertido e classificados como vivos ou mortos quando não corados ou corados com AT, respectivamente. 150

folículos foram analisados por tratamento, totalizando 1650 folículos nas cinco repetições em todos os tratamentos testados.

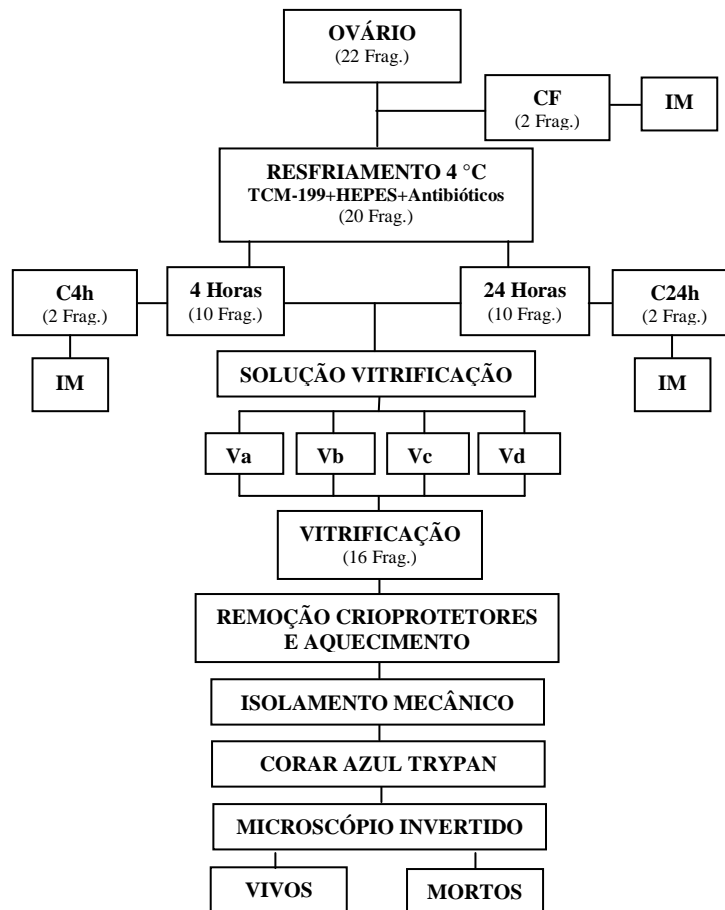


Figura 6. Representação esquemática da análise da viabilidade de folículos pré-antrais solados mecanicamente do tecido ovariano bovino.

Frag.: Fragmentos; IM: Isolamento Mecânico; CF: Controle fresco; C4h: Controle de fragmentos resfriados por 4 horas; C24h: Controle de fragmentos resfriados por 24 horas; Va; Vb; Vc; Vd: Solução de vitrificação a, b, c, d, respectivamente.

5.3 Análises estatísticas

Para avaliar o efeito do tempo sobre os fragmentos ovarianos resfriados a 4 °C e analisar as porcentagens de folículos viáveis avaliados com AT, foi utilizado o Teste de Qui-quadrado a 5% de probabilidade (SAMPAIO, 2002) ou o Teste Exato de Fisher quando o número de repetições foi menor que 30 folículos. Para a morfologia folicular, foi utilizado o seguinte modelo experimental:

$$y_{ijk} = \mu + t_i + v_j + t_i * v_j + e_{ijk}$$

Em que, y_{ijk} = corresponde às variáveis respostas (primordial normal, primordial degenerado, transição normal, transição degenerado, primário normal, primário degenerado, secundário normal, secundário degenerado); μ = média geral para cada variável; t_i = efeito do tempo de resfriamento (4 e 24 horas) sobre as variáveis respostas; v_j = efeito das soluções de vitrificações (controle, Va, Vb, Vc e Vd) sobre as variáveis respostas; $t_i * v_j$ = efeito da interação entre os fatores tempo de resfriamento e solução de vitrificação; e_{ijk} = efeito residual incidente em cada uma das repetições.

A Análise de Variância (ANOVA) foi executada por meio do Procedimento PROC GLM do Programa SAS, utilizado para comparar os dois tempos de resfriamento, enquanto para a solução de vitrificação os resultados que diferiram estatisticamente pela ANOVA foram testados pelo SNK (Student Newman Keuls Test), também ao nível de 5% de probabilidade.

6. RESULTADOS

Experimento I: Morfologia de folículos ovarianos pré-antrais bovinos, resfriados a 4 °C por quatro e 24 horas e vitrificados em solução de DMSO e EG acrescidos ou não de SAC e/ou AA.

Análise morfológica de FOPAs bovinos após resfriamento

Para avaliar a morfologia de FOPAs após resfriamento a 4 °C foram analisados 450 folículos pré-antrais (150 folículos por tratamento; Tabela 3). Na avaliação, foi constatado que não houve diferença ($P>0,05$) entre o grupo controle fresco e o grupo resfriado por 4 horas, sendo as percentagens de folículos morfolologicamente normais de 99,3 % e 96,0 % respectivamente. Em contraste, a conservação de folículos no meio-transporte por 24 horas mostrou uma redução na porcentagem ($P<0,01$) de folículos normais (86,0 %).

Tabela 3. Análise morfológica de FOPAs bovinos frescos e após resfriamento a 4 °C, durante quatro e 24 horas.

TRATAMENTOS	FOPAs NORMAIS		Geral
	N	%	
CF	149 ^a	99,3	150
C4h	144 ^a	96,0	150
C24h	129 ^b	86,0	150

Valores com letras diferentes sobrescritas (a, b) indicam diferença ($P<0,01$) entre tratamentos pelo teste do qui-quadrado. CF: Controle fresco (zero hora); C4h: Controle de FOPAs resfriados a 4°C por quatro horas. C24h: controle de FOPAs resfriados 4°C por 24 horas.

Análise morfológica de FOPAs bovinos após vitrificação

A interação entre o tempo de resfriamento (4 e 24 h) e as soluções de vitrificação, não apresentou efeito ($P>0,05$) para nenhum dos folículos classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento e morfolologicamente como normais e

degenerados. Desconsiderando o efeito do tempo e a interação tempo e solução de vitrificação, a tabela 4 mostra o efeito das soluções de vitrificação sobre os FOPAs.

Foram avaliados 1500 FOPAs após vitrificação, sendo 785 folículos classificados morfológicamente normais assim distribuídos: 273 para o grupo controle (C), 112 para o tratamento Va (TCM-199+DMSO+EG), 126 para o tratamento Vb (TCM-199+DMSO+EG+SAC), 153 para o tratamento Vc (TCM-199+DMSO+EG+AA) e 121 para o tratamento Vd (TCM-199+DMSO+EG+SAC+AA), os restantes foram considerados folículos degenerados. Após as análises dos dados, foi observada uma diminuição ($P<0,05$) nos FOPAs normais após vitrificação com relação ao grupo controle. No entanto, quando comparado os tratamentos de vitrificação, a solução Vc foi mais efetiva que os demais tratamentos no que se refere a manter a viabilidade folicular ($P<0,05$), apresentando um alto número de folículos com o oócito intacto circundado por células da granulosa bem organizadas. Folículos vitrificados na solução Vb e Vd apresentaram danos como retração oocitária e presença de núcleo picnótico e no tratamento Va, além da degeneração do oócito, as células da granulosa se encontravam desorganizadas.

Tabela 4. Percentual de FOPAs morfológicamente normais ou degenerados após vitrificação.

SOLUÇÃO DE VITRIFICAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO	
	NORMAIS	DEGENERADOS
C	91,0 ^a	9,0 ^c
Va	37,3 ^c	62,7 ^a
Vb	42,0 ^c	58,0 ^a
Vc	51,0 ^b	49,0 ^b
Vd	40,3 ^c	59,7 ^a

Valores com letras diferentes sobrescritas (a,b,c) na mesma coluna indicam diferença ($P<0,05$) na classificação de FOPAs normais e degenerados pelo teste de medias SNK (Student Newman Keuls). C: Controles resfriados a 4°C por quatro e 24 horas. Va: solução de vitrificação meio TCM-199 + Dimetilsulfóxido 1,5M (DMSO) + Etilenoglicol 1,5M (EG). Vb: solução de vitrificação TCM-199 + DMSO 1,5M + EG 1,5M + Sacarose 0,5M (SAC). Vc: solução de vitrificação TCM-199 + DMSO 1,5M + EG 1,5M + Acido Ascórbico 0,1 mmol/L (AA). Vd: solução de vitrificação TCM-199 + DMSO 1,5M + EG 1,5M + SAC 0,5M + AA 0,1 mmol/L.

Experimento II: Viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais bovinos, resfriados a 4 °C por quatro e 24 horas e vitrificados em solução de DMSO e EG acrescidos ou não de SAC e/ou AA.

A análise de viabilidade folicular foi realizada por meio da coloração Azul de Trypan. A figura 7 ilustra folículos viáveis e não viáveis após procedimento de resfriamento e vitrificação.

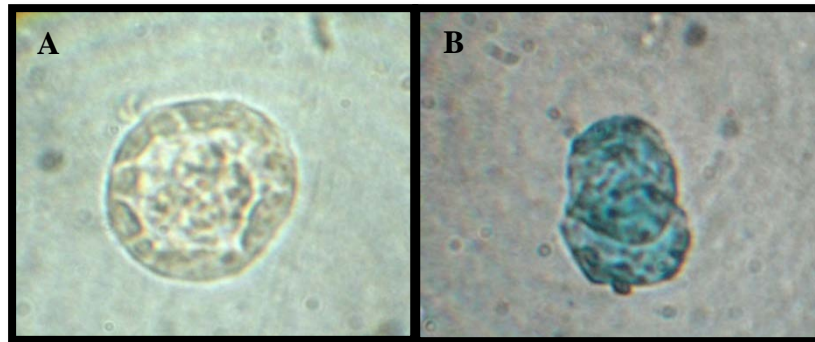


Figura 7. Folículos pré-antrais mecanicamente isolados e expostos ao corante vital azul de Trypan. (A) Folículo pré-antral vivo (não corado). (B) Folículos pré-antrais mortos (corados).

Análise da viabilidade de FOPAs bovinos após resfriamento

Analisaram-se 450 folículos pré-antrais isolados pelo método de isolamento mecânico do tecido ovariano bovino (150 folículos por tratamento), para avaliar a viabilidade após resfriamento a 4 °C. O resfriamento dos FOPAs conservados no meio-transporte por quatro e 24 horas reduziu ($P < 0,01$) a porcentagem de folículos viáveis (78,7 e 74 %, respectivamente) em relação aos folículos do grupo controle (94 %), no entanto, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) na porcentagem de folículos a 4 °C entre os dois períodos de resfriamento (Tabela 5).

Análise da viabilidade de FOPAs bovinos após vitrificação

A análise da viabilidade com Azul Trypan feita em 1.650 folículos pré-antrais bovinos revelou que somente o tratamento (V4c) contendo os agentes crioprotetores DMSO, EG e suplementados com AA foi capaz de manter uma porcentagem de folículos viáveis semelhante ao controle 24 h (66 e 74 %, respectivamente; $P > 0,05$),

diferente dos tratamentos restantes que mostraram uma redução ($P < 0,05$) do número de folículos viáveis após a vitrificação (Tabela 5). O tratamento V24c mostrou melhor capacidade de manutenção da viabilidade dos FOPAs em relação aos demais tratamentos de vitrificação de fragmentos resfriados por 24 horas (60 %; $P < 0,05$), e não mostrou diferenças ($P > 0,05$) quando comparado aos tratamentos de vitrificação de fragmentos de tecido ovariano resfriados por 4 horas (V4a, V4b, V4c, V4d), indicando uma vez mais a importância do AA na manutenção de folículos viáveis após vitrificação, aquecimento e isolamento mecânico. Além disso, os resultados demonstraram que FOPAs do tratamento V24a foram os que apresentaram maiores danos na integridade da membrana mostrando uma alta porcentagem de folículos mortos (62 %).

Tabela 5. Viabilidade de folículos pré-antrais isolados do tecido ovariano bovino, após resfriamento e vitrificação.

TRATAMENTO	N	VIVOS	%
CF	150	141	94,0 ^a
C4h	150	118	78,7 ^b
C24h	150	111	74,0 ^{bc}
V4a	150	86	57,3 ^{def}
V4b	150	89	59,3 ^{de}
V4c	150	99	66,0 ^{cd}
V4d	150	80	53,3 ^{efg}
V24a	150	57	38,0 ^h
V24b	150	65	43,3 ^{gh}
V24c	150	90	60,0 ^{de}
V24d	150	70	46,7 ^{fgh}

Valores com letras diferentes sobrescritas (a,b,c,d,e,f,g,h) indicam que houve diferença ($P < 0,05$) entre tratamentos pelo teste do qui-quadrado. **CF:** Controle fresco. **C4h:** Controle resfriado a 4 °C por quatro horas. **C24h:** controle resfriado 4 °C por 24 horas. **V4a, V24a:** resfriamento por quatro e 24 horas respectivamente e vitrificados no meio TCM-199 + Dimetilsulfóxido 1,5M (DMSO) + Etilenoglicol 1,5M (EG). **V4b, V24b:** resfriamento por quatro e 24 horas respectivamente e vitrificados no meio TCM-199 + DMSO 1,5M + EG 1,5M + Sacarose 0,5M (SAC). **V4c, V24c:** resfriamento por quatro e 24 horas respectivamente e vitrificados no meio TCM-199 + DMSO 1,5M + EG 1,5M + Acido Ascórbico 0,1 mmol/L (AA). **V4d, V24d:** resfriamento por quatro e 24 horas respectivamente e vitrificados no meio TCM-199 + DMSO 1,5M + EG 1,5M + SAC 0,5M + AA 0,1 mmol/L.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano bovino são conservados eficientemente a 4 °C por até 4 horas em meio TCM-199+HEPES e antibióticos, e que a associação dos agentes crioprotetores penetrantes DMSO / EG com o agente antioxidante AA melhora as taxas de sobrevivência e viabilidade durante a vitrificação de folículos pré-antrais bovinos.

Durante o transporte dos ovários para o laboratório, a ausência de aporte vascular impede o suprimento de oxigênio e energia para os ovários (CHAVES et al., 2008). A privação de oxigênio do tecido resulta em uma mudança do metabolismo aeróbico para anaeróbico, sendo o ácido láctico o produto principal, acumulado dentro da célula causando redução do pH (WONGSRIKEAO et al., 2005). Com a intenção de reduzir esses efeitos foi usado o resfriamento para provocar uma redução no metabolismo celular, aumentando a resistência de folículos à redução de nutrientes e oxigênio durante a preservação *in vitro* (SILVA et al., 2003). O resfriamento de fragmentos ovarianos a 4 °C manteve a porcentagem de folículos pré-antrais normais similar à de folículos controle fresco por até 4 horas. A conservação bem sucedida de ovários a 4 °C também foi demonstrada em soluções simples, como a solução salina 0,9% (Bovinos: LUCCI et al., 2004b; LUNA et al., 2008a; Caprinos: CARVALHO et al., 2001; COSTA et al., 2002; Ovinos: ANDRADE et al., 2001; Suínos: LUCCI et al., 2007; BRITO, 2008), em soluções hiperosmóticas, como a solução Braun-Collins (Caprinos: SILVA et al., 2000) ou em soluções ricas em nutrientes, como o TCM-199 (Bovinos: CELESTINO et al., 2007; Caprinos: FERREIRA et al., 2001, COSTA et al., 2005; Ovinos: ANDRADE et al., 2002; MATOS et al., 2004). Os folículos pré-antrais utilizam nutrientes de duas fontes, uma de seu próprio estoque endógeno e outra, o meio de conservação utilizado (SANTOS et al., 2002). Neste estudo, FOPAs bovinos foram capazes de sobreviver com suas reservas energéticas e nutrientes: glicose, sais inorgânicos, vitaminas e aminoácidos proporcionados pelo meio TCM-199. Outros estudos têm comparado a eficiência do TCM-199 com a solução salina 0,9 % (SS) na preservação de FOPAs na espécie bovina (CELESTINO et al. 2007) e ovina (MATOS et al., 2004) mostrando a importância da composição do meio TCM-199 para a manutenção da viabilidade folicular, especialmente quando o tempo e temperatura de incubação são aumentados, pois, com o aumento do metabolismo, aumenta

consequentemente o consumo de nutrientes do meio. No presente estudo, foi observado também que os fragmentos ovarianos submetidos a 24 horas de resfriamento aumentaram a porcentagem de FOPAs degenerados, isto pode ser devido a alterações na permeabilidade da membrana celular induzida pela falta de oxigênio, que podem levar ao aumento de água intracelular e do volume celular, vacuolização citoplasmática e, consequentemente, degeneração celular (BARROS et al., 2001).

A preservação dos FOPAs pode ser realizada por um curto (resfriamento) e longo período (criopreservação) e a associação destas duas técnicas é essencial para garantir que as células permaneçam com uma baixa taxa metabólica durante um determinado tempo de estocagem, a fim de que possam ser resgatadas para continuar o seu desenvolvimento *in vitro*. Conforme os resultados obtidos neste trabalho, indiferentemente do tempo de resfriamento, os FOPAs que foram vitrificados mostraram uma redução no percentual de folículos classificados morfológicamente como normais. As lesões causadas nas células são atribuídas à intensa liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). O acúmulo dos ROS na célula promove o estresse oxidativo, que é caracterizado por um distúrbio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes da célula (AGARWAL et al., 2005). Em situações que existe maior ocorrência de eventos oxidativos, o sistema tende para o lado pró-oxidativo, o que pode afetar os níveis de antioxidantes intracelulares e, dependendo da severidade deste processo, pode ser letal à célula (DE LAMIRAANDE & GAGNON, 1995). Quando foram comparados os tratamentos de vitrificação, foi determinado que FOPAs bovinos vitrificados na presença de DMSO e EG adicionados do agente antioxidante AA conservam eficientemente os folículos diminuindo as crioinjúrias. Resultados semelhantes foram encontrados por Lane et al. (2002) utilizando a mesma concentração (0,1 mM) de ascorbato na criopreservação de embriões de camundongas. Além disso, o uso do AA tem sido bem sucedido na criopreservação de sêmen (Bovino: BORGES, 2003; FOOTE et al., 2002; Caprino: CASTILHO et al., 2009), assim como no cultivo *in vitro* de FOPAs (Bovinos: TOMAS et al., 2001; Caprinos: ROSSETTO et al., 2009, SILVA et al., 2011 e Camundongas: MURRAY et al., 2001). Em geral, as substâncias antioxidantes permitem maior proteção às membranas plasmáticas por agirem removendo os radicais livres. A manutenção da integridade morfológica das células germinativas também foi demonstrada no emprego de outros antioxidantes como o α -tocoferol na vitrificação de FOPAs bovinos (JIMENEZ, 2010) ou seu análogo

hidrossolúvel Trolox C na criopreservação de sêmen bovino (BORGES, 2008) assim como na adição do agente enzimático Catalase na solução de congelamento do tecido ovariano caprino (LUZ, 2010).

Todas as soluções de vitrificação deste trabalho possuíam a combinação dos agentes crioprotetores penetrantes (DMSO e EG), que têm sido relatados como os melhores agentes crioprotetores por diminuírem os danos para os oócitos e folículos pré-antrais em diferentes espécies (Bovinos: LUCCI et al., 2004a; CELESTINO et al., 2008; Suínos: BORGES, 2009a; Caprinos: SANTOS et al., 2006b; RODRIGUES et al., 2004; Ovinos: SANTOS et al., 2006a; CAPPACHIETTI et al., 2004; CECCONI, 2004; Humano: SCHMIDT et al., 2003; Felinos: LIMA et al., 2006), em função de sua fácil permeabilidade no tecido. Entretanto, quando os tecidos ovarianos contendo FOPAs foram expostos à solução de vitrificação DMSO, EG acrescidos ou não de SAC durante cinco minutos e em seguida colocados no Nitrogênio Líquido, as porcentagens de degeneração morfológica aumentaram, sem manifestar diferença entre os tratamentos. Porém, a SAC parece não ser efetiva na vitrificação de FOPAs bovinos, visto que a adição deste crioprotetor aumenta a propensão a lesões intracelulares. Bao et al. (2010) ao usarem o mesmo protocolo, evidenciaram a geração de danos osmóticos em folículos primordiais quando usaram SAC na solução de vitrificação. Em estudos anteriores, Bicalho e Luna (2008) utilizando o crioprotetor EG na presença ou não de SAC e concluíram que SAC não confere proteção aos folículos e sugeriram ainda que seu uso seja desnecessário no processo de criopreservação. Em contraste, pesquisas feitas em outras espécies, relatam o efeito benéfico da utilização da SAC na solução de criopreservação. Salehnia et al. (2002) mostrou um efeito protetor da vitrificação com 40% EG + 0,5 M de sacarose na ultraestrutura de FOPAs murinos. Anos mais tarde, Hasegawa et al. (2004) demonstrou ainda o crescimento *in vitro* de FOPAs murinos, as quais foram isoladas a partir de tecidos de ovário vitrificados em presença dos agentes crioprotetores EG, DMSO e SAC. Santos et al. (2007) utilizando estes mesmos agentes demonstrou que FOPAs ovinos podem manter a morfologia e viabilidade após vitrificação.

A criopreservação pode induzir ruptura da membrana celular imperceptíveis após análise por histologia clássica, e resultar na morte de folículos após o aquecimento (MARTINEZ-MADRID et al., 2004). Assim, células morfológicamente intactas podem

não permanecer viáveis ou funcionais (SANTOS, 2005). Com base nisto, foi empregado o corante azul de trypan para verificar a viabilidade da população de folículos isolados via penetração do corante nas membranas danificadas (AMORIM et al., 2003) considerando como mortos os folículos corados e vivos os não corados. Esse método mostrou que o percentual de FOPAs viáveis após resfriamento e vitrificação no meio TCM-199 acrescidos de DMSO, EG e AA foi melhor em comparação aos outros tratamentos de vitrificação, apresentando semelhança com o grupo controle 24 horas, isto ratifica uma vez mais, a importância do agente antioxidante na preservação das membranas celulares e sobrevivência de FOPAs. Mas, apesar dos resultados obtidos, o tratamento anteriormente mencionado (TCM-199, DMSO, EG e AA) reduziu a viabilidade folicular em relação ao controle quatro horas e controle fresco ou não vitrificado. Esta redução na porcentagem tem sido causada pela manipulação dos FOPAs após aquecimento e isolamento mecânico. A separação das células do tecido ovariano pode aumentar a probabilidade de modificações prejudiciais, seja pelos componentes extracelulares, por procedimentos laboratoriais ou implementos utilizados para seu procedimento (JIMENEZ, 2010). É importante que a análise da viabilidade no microscópio invertido seja contínua aos procedimentos de isolamento para evitar injúrias na estrutura dos FOPAs.

6. PERSPECTIVAS

No presente estudo verificou-se a eficiência do AA na manutenção da morfologia assim como na viabilidade de FOPAs bovinos durante o processo de vitrificação, podendo ser uma alternativa na composição da solução para a criopreservação de folículos. No entanto, faz-se necessária a execução de mais pesquisas, no sentido de determinar a concentração ideal do antioxidante AA na vitrificação de FOPAs isolados ou inclusos no tecido ovariano. Além disso, recomenda-se a realização de um cultivo *in vitro* do tecido ovariano, a fim de comprovar a capacidade do folículo em manter-se viável e funcionalmente normal, após o procedimento de vitrificação descrito neste estudo.

7. CONCLUSÕES

- Folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano bovino conservam a morfologia eficientemente quando são resfriados a 4 °C por até 4 horas em meio TCM-199+HEPES+Antibióticos.
- A associação dos agentes crioprotetores penetrantes DMSO / EG com o agente antioxidante ácido ascórbico (AA) melhora as taxas de sobrevivência e melhora o percentual de células com integridade morfológica na vitrificação de folículos pré-antrais bovinos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKER, J.P. The use of intracellular protectants in cell biopreservation. In: BAUST, J.G.; BAUST, J.M. (Ed.). **Advances in Biopreservation**. Taylor and Francis: Boca Raton, p. 299-320, 2007.
- AERTS, J. M. J.; DE CLERCQ, J. B. P.; ANDRIES, S.; et al. Follicle survival and growth to antral stages in short-term murine ovarian cortical transplants after Cryologic solid surface vitrification or slow-rate freezing. **Cryobiology**, v. 57, p. 163-169, 2008.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.A.; SAID, T.M.; Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. **Journal of Andrology**. v.26, p.654-660, 2005.
- AL-AGHBARI, A. M.; MENINO JR, A. R.;Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissues. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.101-110, 2002.
- AMORIM, C.A.; LUCCI, C.M.; RODRIGUES, A.P.R.; et al. Quantitative and qualitative analysis of the effectiveness of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries. **Theriogenology**, v. 53, p.1251-1262, 2000.
- AMORIM, C.A.; RONDINA, D.; RODRIGUES, A.P.R.; et al. Isolated ovine primordial follicles cryopreserved indifferent concentrations of ethylene glycol. **Theriogenology** v.60, p.735-742, 2003.
- ANDRADE, E.; RODRIGUES, A.P.; CARVALHO, F.C.A. Short term maintenance of sheep preantral follicles in situ in 0.9% saline and Braun. **Small Ruminant Research**. v.41, p.14-147, 2001.
- ANDRADE, E.R.; AMORIM, C.A.; MATOS, M.H.T.; et al. Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles in situ. **Small Ruminant Research**. v.43, p. 235-43. 2002.

- ARAV, A.; REVEL, A.; NATHAN, Y.; et al. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. **Human Reproduction**, v. 20, p. 3554-3559, 2005.
- BAO, R.; YAMASAKA, E.; MONIRUZZAMAN, M. Development of vitrified bovine secondary and primordial follicles in xenografts. **Theriogenology**. v.74, p.817–827, 2010.
- BARJA, G.; LOPEZ-TORRES, M.; PEREZ-CAMPO, R.; et al. Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde, and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver. **Free Radical Biology & Medicine**. v.17, p.105–115, 1994.
- BARROS, L.F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.130, p.401-409, 2001.
- BETTERIDGE, K.J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R.B. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.87-98, 1989.
- BIANCHI, V.; COTICCHIO, G.; FAVA, L. Meiotic spindle imaging in human oocytes frozen with a slow freezing procedure involving high sucrose concentration. **Human Reproduction**, v.20, p.1078-1083, 2005.
- BICALHO, F.A.; LUNA H.S. **Etilenoglicol com ou sem sacarose na vitrificação de folículos pré-antrais bovinos**. Artigo (Iniciação científica em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Minas Gerais/ Minas Gerais, 2008.
- BORDES, A. LORNAME, J. DEMIRCI, B. et al.; Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified–warmed hemi-ovaries into ewes. **Human Reproduction**, v.20, p.2745-2748, 2005.

- BORGES, J.C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino.** 2003. 73f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.
- BORGES, J.C.; **Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial, fecundação *in vitro* e mensuração de radicais livres.** 2008. Tese de Doutorado: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2008.
- BORGES, E.N.; SILVA, R.C.; FUTINO, D.O.; et al. Cryopreservation of swine ovarian tissue: effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. **Cryobiology**, v.59, p.195–200, 2009a.
- BORGES, E.N. **Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais suínos.** 2009b. Dissertação (Mestrado em biologia animal), Universidade de Brasília/Brasília DF. 2009b.
- BRISTOL-GOULD S., WOODRUFF TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.66, p.5- 13, 2006.
- BRITO, R.C.B.; **Efeito da conservação de ovários a baixas temperaturas na morfologia de ovócitos imaturos inclusos em folículos ovarianos primordiais suínos.** 2008. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- BUETTNER, G.R. The pecking order of free-radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v.300, p.535–43, 1993.
- BUKOVSKY, A.; CAUDLE, M.R.; SVETLIKOVA, M. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.4, p.2-20, 2004.

- CABODEVILA, J.; TERUEL, M. Criopreservación de embriones bovinos. In: PALMA, G. A.; **Biología de la Reproducción**. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, p.149-167. 2001.
- CADENAS, S.; ROJAS, C.; BARJA, G. Endotoxin increases oxidative injury to proteins in guinea pig liver: protection by dietary vitamin C. **Pharmacology Toxicology**, v. 82, p. 11-8, 1998.
- CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. **Journal Reproduction Fertility**, v.110, p.11-19, 1997.
- CAPACCHIETTI, G., CECCONI, S., TURRIANI, M. Effect of cryoprotectant agents on the potential development of sheep preantral follicles. **Veterinary Research Communications**. v. 28, p. 173-176, 2004.
- CASTILHO, E.F.; GUIMARÃES, J.D.; MARTINS, L. F.; et al. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.38, p. 2335-2345, 2009.
- CARVALHO, F.C.; LUCCI, C.M.; SILVA J.R.; et al. Effect of Braun-Collins and saline solution at different temperatures and incubation times on quality of goat preantral follicles preserved *in situ*. **Animal Reproduction Science**, v.66, p.195-208, 2001.
- CARVALHO, A.A.; **Vitrificação: alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas para a implantação de criobancos**. 2010. Capítulo I. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Piauí. Teresina. 2010.
- CECCONI, S., CAPACCHIETTI, G., RUSSO, V., BERARDINELLI, P., MATTIOLI, M. *In vitro* growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. **Biology of Reproduction**. v. 70, p. 12-17, 2004.

- CELESTINO, J.H.; SANTOS, R.R.; MARTINS, F.S.; Conservação de folículos pré-antrais bovinos em solução salina 0,9% ou TCM 199. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.591-599, 2007.
- CELESTINO, J. J. H.; SANTOS, R. R.; LOPES, C. A. P.; et al. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 309-318, 2008.
- CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; SARAIVA, M. V.; et al. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. **Reproduction, Fertility and development**. v. 20, p. 640-647, 2008.
- CHEN, Z.J.; LI, M.; LI, Y.; et al. Effects of sucrose concentration on the developmental potential of human frozen-thawed oocytes at different stages of maturity. **Human Reproduction**.v.19, p.2345-2349, 2004.
- CHEN, S.U.; CHIEN, C.L.; WU, M.Y. et al. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. **Human Reproduction**, v.21, p.2794-2800, 2006.
- CHIAN, R. C.; KUWAYAMA, M.; TAN, L.; et al. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. **Journal of Reproduction and Development**.v.50, p.685-696, 2004.
- CHOI, J. Y.; LEE, B. E.; LEE, E.; et al. Cryopreservation of ovarian tissue temporarily suppresses the proliferation of granulosa cells in mouse preantral follicles. **Cryobiology**, v.56, p. 36-42, 2008.
- CORTES C.G.; RODRIGUES J.L.; Sobrevivência de blastocistos *mus domesticus domesticus* vitrificados em meio contendo 9,0m de etilenoglicol na presença de sacarose. **Ciência Rural**. v. 30, n. 3, 2000.
- CORTVRINDT, R. e SMITZ, J.E.J. In vitro follicle growth: Achievements in mammalian species. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 3-9, 2001.

- COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; FERREIRA, M.A.L.; et al. Preservation of goat preantral follicles in saline or coconut water solution. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.39, p.324-330, 2002.
- COSTA, S.H.F.; ANDRADE, E.R.; SILVA, J.R.V.; et al. Preservation of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue in saline or TCM 199 solutions. **Small Ruminant Res**, v.58, p.189-193, 2005.
- DE LAMIRANDE & E. GAGNON C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. **Free Radical Biology and Medicine**. v.18, p.487-495, 1995.
- DELA PEÑA, E.C.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. **Reproduction**, v.123, p.593–600, 2002.
- DEMIRCI, B.; SALLE, B.; FRAPPART, L.; et al. Morphological alterations and DNA fragmentation in oocytes from primordial and primary follicles after freezing–thawing of ovarian cortex in sheep. **Fertility and Sterility**, v.77, p.595-600, 2002.
- DE SANTIS L.; CINO, I.; COTICCHIO, G.; et al. Objective evaluation of the viability of cryopreserved oocytes. **Reproductive Biomedicine Online**. v 15, p.338–345, 2007.
- DOBRINSKY, J. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v.45, p.17-26, 1996.
- DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v.55, p.1211-1239, 2001.
- DRUMMOND, A.E. The role of steroids in follicular growth. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.4, p.1-11, 2006.

- ELMOAZZEN, H.Y.; ELLIOTT, J.A.W.; MCGANN, L.E. Cryoprotectant equilibration in tissues. **Cryobiology**, v. 51, p. 85-91, 2005.
- EPPIG, J.J.; HOSOE, M.; O'BRIEN, M.J.; et al. Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, p.109–116, 2000.
- ERICKSON, B.H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. **Journal Reproduction Fertility**, v.10, p.97-105, 1966.
- ERICKSON, G.F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Reproductive Endocrinology**; v.4, p.233-254, 1986.
- FARBER, J.L. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. **Laboratory Investigation**. v.47, p.114-123, 1982.
- FAUSTINO, L.R.; SANTOS, R.R.; SILVA, C.M.G.; et al. Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: Effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.90-97, 2010.
- FERREIRA, A.M. **Reprodução da Fêmea Bovina: Fisiologia Aplicada e Problemas mais comuns (causas e tratamentos)**. 1.ed. Juiz de Fora: Minas Gerais, p. 245-283, 2010.
- FERREIRA, M.A.L.; BRASIL, A.F.; SILVA, J.R.V.; et al. Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarian preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid supplementation. **Theriogenology**, v.55, p.1607-17, 2001.
- FIERS, W.; BEYAERT, R.; DECLER, C.Q.W. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. **Oncogene**, v.18, p.7719-7730, 1999.
- FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; Manipulação de Oócitos Incluídos em Folículos Ovarianos Pré-antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, p.227-256, 2002.

- FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Roca, p.303–327. 2008.
- FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.135-163, 2003.
- FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.13-23, 2002.
- FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, B.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Medical Sciences**.v. 86, p.6377-6381, 1989.
- FULLER, B.; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reproductive BioMedicine Online**, v.9, p.680-691, 2004.
- GONZÁLEZ, F.H.D. **Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, p.83. 2002.
- GORDON, I. Recovering the primary oocyte. In: GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge: CAB International, p.82, 1994.
- GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, p.33-41, 2000.
- GUNASENA K. T.; VILLINES P.M.; CRISTER E.S.; CRITSER J. K. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. **Human Reproduction**. v.12, p.101–106, 1997.

GUYADER-JOLY, C. **Activité métabolique et aptitude à la congélation de l'embryon bovin produit in vitro**. 1998. Tese (Doutorado em Sciences de la Vie), Université de Paris VI, France: Paris.1998.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, p.69. 2004.

HANZEN, C.H.; LOURTIE, O.; DRION, P.V. Le développement folliculaire chez la vache. I. Aspects morphologiques et cinétiques. **Annales de Médecine Veterinaire**, v.144, p.223-235, 2000.

HASEGAWA, A., HAMADA, Y., MEHANDJIEV, T. In vitro growth and maturation as well as fertilization of mouse preantral oocytes from vitrified ovaries. **Fertility and Sterility**, 81:824-830, 2004.

HIRSHFIELD, A. N. Rescue of atretic follicles in vitro and in vivo. **Biology Reproduction**, v.40, p. 181-190, 1989.

HOVATTA, O.Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. **RBM Online**, v.10, p.729-734, 2005.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F. et al. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**. v.2, p.78-80, 1994.

HUSSEIN, M.R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reproduction**. v.1, p.162-178, 2005.

HSU, S.Y.; HSUEH, A.J. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. **Physiological Reviews**. v.80, p.593-614, 2000.

ISHIJIMA, T.; KOBAYASHI Y.; LEE, D.S.; et al.; Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. **Journal of Reproduction and Development**. v.52, p.293-299, 2006.

- ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; RAHIMI, G. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. **European Journal of Obstetrics & Gynecology Reproductive Biology**, v.108, p.186-193, 2003.
- JAIN JK, PAULSON RJ. Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v.86, p.1037-1046, 2006.
- JEWGENOW, K., PENFOLD, L.M., MEYER, H.H.D., WILDT, D.E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.112, p.39-47, 1998.
- JIMENEZ, C. R.; **Vitrificação de folículos ovarianos Pré-antrais de fêmeas bovinas com dimetilsulfóxido e sacarose acrescido de α – tocoferol**. 2010. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2010.
- JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell**, v. 122, p. 303-315, 2005.
- KAGAWA N.; SILBER S.; KUWAYAMA M.; Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Reproductive Biomedicine Online**. v.18, p.568 –77, 2009.
- KARTHA, K.K. **Meristem culture and germplasm preservation**. In: KARTHA, K.K. (Ed.) Cryopreservation of plant cells and organs. Boca Raton: Florida, CRC Press, p.115-134.1985.
- KIDDER, G.M. & MHAWI, A.A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction**. v. 123, p. 613, 2002.
- KIMURA, H.; YAMADA, Y.; MORITA, Y. Dietary ascorbic acid depresses plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation in genetically scorbutic rats. **Journal of Nutrition**, v.9, p.122-1904, 1992.

- KNIGHT P.G., GLISTER C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. **Society for Reproduction and Fertility**. v.131, p.191-206, 2006.
- LANE, M.; MAYBACH J.M.; GARDNER D.K.; Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. **Human Reproduction** v.17, p.2686–2693, 2002.
- LEE D.; OUHIBI N.; BATTAGLIA D.; Cryopreservation of ovarian tissue: Banking Reproductive Potencial for the future. **Current Womens Health Reports**. v.1, p.152-156, 2001
- LIMA, A. K.; SILVA, A. R.; SANTOS, R. R. et al. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. **Theriogenology**. v.66, p.1664–1666, 2006.
- LIMA, I. M. **Desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos na presença de kit ligand (KL) e proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15)**. 2012. Tese (Doutorado), Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Doutorado em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2012.
- LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; BÁO, S.N.; et al. Effect of the interval of sections of ovarian tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.56, p.39-49, 1999.
- LUCCI, C.M.; SILVA, J.R.V.; CARVALHO, F.C.A. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminants Research**, v.41, p.61-69, 2001.
- LUCCI, C.M.; KACINSKIS, M.A.; LOPES, L.H.R. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**, v.61, p.1101-1114, 2004a.

LUCCI, C.M.; KACINSKIS, M.A.; RUMPF, R.; BAO, S. Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. **Theriogenology**. v.61, p.461–472, 2004b

LUCCI, C.M.; SCHREIER, L.L.; MACHADO, G.M. Effects os storing pig ovaries at 4 °C or 20 °C for different periods of time on the morphology and viability of preantral follicles. **Reproduction in Domestic Animal**. v.42, p.72-82, 2007.

LUCK, M.R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLES, R.A. Ascorbic acid and fertility. **Biology of Reproduction**, v.52, p.262–266, 1995.

LUNA H.S.; DARBELLO D.M.; MESNEROV S.O. Morfometria, células da granulosa e cromatina nuclear de folículos préantrais em associação ou não com a vitrificação de tecido ovariano bovino. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** v.3, p.371-375, 2008a.

LUNA, H. S.; MUNHOZ A. L. Morfometria e número de células da granulosa de folículos ovarianos pré -antrais de bovinos (*Bos indicus*) preservados a 4 °C em solução salina por diferentes períodos de tempo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.9, n.1, p. 01-06, 2008b.

LUTSENKO, E.A.; CARCAMO, J.M.; GOLDE, D.W. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 16895–9, 2002.

LUZ, H.K.M.; **Determinação de uma solução para congelamento lento de tecido ovariano caprino: utilização de propanodiol e agentes antioxidantes**. 2010. Dissertação (mestrado em ciências veterinárias). Faculdade de Veterinária da Universidade estadual do Ceará. Fortaleza-Ceará. 2010.

MALTARIS, T. BECKMANN, M.W.; DITTRICH, R. Fertility Preservation for Young Female Cancer Patients. **In Vivo**, v.23, p.123-130, 2009.

- MANDELBAUM, J.; JUNCA, A.M.; PLACHOT, M.; et al. Human embryo cryopreservation, extrinsic and intrinsic parameters of success. **Human Reproduction**, v. 2, p. 709-715, 1988.
- MARTINEZ-MADRID, B.; DOLMANS, M.M.; VAN LANGENDONCKT, A. et al. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. **Fertility and Sterility**. v.82. p.1390-1394, 2004.
- MATOS, M.H.T.; ANDRADE, E.R.; LUCCI, C.M.; et al. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. **Theriogenology**, v. 62, p. 65–80, 2004.
- MAZUR, P. Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities. **Origins of life**, v. 10, p. 137-159, 1980.
- McGEE, E.A.; HSUEH, A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v. 21, p. 200-214, 2000.
- MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE, J. Mitochondria and apoptosis. **European Journal of Biochemistry**. v.252, p.1-15, 1998.
- MONIRUZZAMAN, M.; BAO, R.M.; TAKETSURU, H. Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. **Theriogenology**. v.72, p.280-288, 2009.
- MUNHOZ, A., SILVA L., Morfometria e número de células da granulosa de folículos pré-antrais bovinos submetidos ao estresse calórico in vitro. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, p.85-88, 2008.
- MURRAY, A.A.; MOLINEK, M.D.; BAKER, S.J.; et al. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. **Reproduction**, v. 121, p. 89-96, 2001.

- NAIK, B.R.; RAO, B.S.; VAGDEVI, R.; et al. Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos. **Animal Reproduction Science**, v.86, p.329-338, 2005.
- OCHSENDORF, F. R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction**, v. 5, p. 399-420, 1999.
- OJEDA, S.R.; ROMERO, C.; TAPIA, V. Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, p. 67-71, 2000.
- OKTAY, K.; KAN, M.T.; ROSENWAKS, Z.Recent progress in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**. v.13, p.263-268, 2001.
- PAYNTER, S.J.; COOPER, A.; FULLER, B. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. **Cryobiology**. v.38, p.301–309, 1999.
- PAYNTER, S.J. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. **Human Reproduction**. v.6, p.449-456, 2000.
- PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R.The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 27-37, 1998.
- PICTON, H.M.; KIM, S.S.; GOSDEN, R.G. Cryopreservation of gonadal tissue and cells. **British Medical Bulletin**. v.56, p.603-615, 2000.
- PINTO, L.C.; SANTOS, R.R.; FAUSTINO, L.R.; et al. Quantification of Dimethyl Sulfoxide Perfusion in Sheep Ovarian Tissue: A Predictive Parameter for Follicular Survival to Cryopreservation. **Cell Preservation Technology**, v. 6, pp. 269–276, 2008.

- PLACIDO J.C. **Avaliação de folículos pré-antrais suínos após resfriamento e criopreservação.** 2009. Dissertação (Mestrado em biologia animal). Universidade de Brasília/Brasília. 2009.
- RACHID, M.A.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, V.A. Apoptosis in the lymphoid depletion induced by T-2 toxin in broiler chicks. Histomorphometry of the bursa of Fabricius. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.6, 2000.
- RAHIMI, G.; ISACHENKO, E. SAUER, H.; et al. Effect of different vitrification protocols for human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis. **Reproduction, Fertility and Development**. v.15, p.343-349, 2003.
- RALL, W.F.; REID, D.S.; POLGE, C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. **Cryobiology**, v.21, p.106-121, 1984.
- RALL, W.F.; FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. **Nature**, v.24, p.387-402, 1985.
- REICHENBACH, H.; OLIVEIRA, MAL.; LIMA, P.F. Transferência e criopreservação de embrião bovino. In: GONÇALVES PB, FIGUEIREDO JR, FREITAS VJF. **Biotecnicas aplicadas à reprodução animal**, São Paulo: Varela, p.127-178, 2002.
- RENESTO A. **Associação das biotécnicas: aspiração folicular guiada por ultrasonografia e superovulação na produção *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos.** 2004. Dissertação (Mestrado Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias), UNESP, campus de Jaboticabal/ São Paulo.2004.
- RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.F.; et al. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. **Theriogenology**, v.61, p. 1009-1024, 2004.
- ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; et al. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular

- viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v.37, p.112-123, 2009.
- ROY, S.K.; TREACY, B.J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fertility and Sterility**.v.54, p.783-790, 1993.
- RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v.24, p. 77-92, 1983.
- SALEHNIA, M.; MOGHADAM, E.A.; VELOJERDI, M.R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue.**Fertility and Sterility**, v.78, p.644-645, 2002.
- SALLE, B.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; BERTHOLLET, C.; LORNAGE, J. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. **Fertility and Sterility**, v. 80, p. 172-177, 2003
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 3.ed. Belo Horizonte – MG, p. 265. 2002.
- SANTOS, R.R.; SILVA, J.R.V.; COSTA, S.H.F.; et al. Effect of 0,9% Saline Solution and Phosphate Buffer Saline at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**. v. 39, p. 254-259, 2002.
- SANTOS, R.R.; **Criopreservação de Folículos Pré-antrais Ovinos**. 2005. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias – Faculdade de Veterinária. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza – Ceará. 2005.
- SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, S.H.F.; et al. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p. 249-263, 2006a.

- SANTOS, R. R. ; THARASANIT, T. ; FIGUEIREDO J. R. ; et al. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. **Cell and Tissue Research**. v. 325, p. 523-531, 2006b.
- SANTOS, R.R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell and Tissue Research**, v.327, p.167-176, 2007.
- SANTOS, R.R.; CELESTINO, J.J.H.; LOPES, C.A.P.; et al. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 09-15, 2008.
- SAUMANDE, J. La folliculogénese chez les ruminants. **Recueil Médecine Vétérinaire**. v.167, p. 205-218, 1991.
- SCHMIDT K. L. T.; ERNST E.; BYSKOV, A.G.; et al. Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation. **Human Reproduction**. v.18, p.2654-2659, 2003.
- SEBRELL, W.H.; HARRIS, R.S. The Vitamins, Chemistry, Physiology, Pathology and Methods. **New York: Academic Press**, v. 1, p. 305-320, 1967.
- SENEDA, M.M.; BORDIGNON, V. Novos conceitos em foliculogênese. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 857-868, 2007.
- SHAW, J.M.; COX, S.L.; TROUNSON, A.O. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 161, p. 103-110, 2000a.
- SHAW, J.M.; WOOD, E.C.; TROUNSON, A.O. Cryopreservation of oocyte and embryo. In: TROUNSON, A.; GARDNER, D. **Handbook of In vitro fertilization**. 2 ed. Florida: CRC Press. p.376-380. 2000b.

- SIEBZEHRUBL, E.; KOHL, J.; DITTRICH, R.; WILDT, L. Freezing of human ovarian tissue –not the oocytes but the granulosa in the problem. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.169, p.109-111. 2000.
- SILVA, J.R.V.; LUCCI, C.M.; CARVALHO, F.C.A.; et al. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved in situ. **Theriogenology**, v. 54, p. 809-822. 2000.
- SILVA, J.R.V.; BRASIL, A.F.; SANTOS, R.R.; et al. Degeneration rate of goat primordial follicles maintained in TCM 199 or PBS at different temperatures and incubation times. **Ciência Rural**, v.33, p. 913-919, 2003.
- SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M.H.T.; et al. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v. 61, p. 1691–1704, 2004.
- SILVA, V.B.; LUNA, H.S. Viabilidade de folículos pré-antrais bovinos vitrificados em suporte plástico. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, p.16-19, 2009.
- SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE, A.B.G.; et al.; Ascorbic acid improves the survival and *in vitro* growth of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**. v.8, p.14-24, 2011.
- STUSHNOFF, C., SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of apple (*Malus species*) genetic resources. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Cryopreservation of Plant Germplasm I*. Berlin: New York, p.87-101. 1995.
- THOMAS, F.H.; LEASK, R.; SRSEN, V.; et al. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 122, p. 487-495, 2001.

- TILLY, J.L.; TILLY, K.I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 136, p. 242–252, 1995.
- TSUJI, M.; ITO, Y.; TERAD, N. Ovarian aromatase action in scorbutic mutant rats unable to synthesize ascorbic acid. **Acta Endocrinologica (Copenh)**, v. 121, p. 595-602, 1989.
- TSURIBE, P.M.; GOBBO, C.A.M.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Viability of primordial follicles derived from cryopreserved ovine ovarian cortex tissue. **Fertility and Sterility**, v. 91, p.1976-1983, 2009.
- TUCKER, D. M.; TOWNSEND D. M. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. **Biomedecine & Pharmacotherapy**, v.59, p.380-387. 2005
- VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; et al. Open pulled straw (ops) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.53-58, 1998.
- VAJTA, G. Criopreservação de ovocitos e embrios produzidos in vitro. **Arquivos da Faculdade de veterinária.UFRGS**. v.28, p.85-97, 2000.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.
- WANDERLEY, L.S. **Criopreservação de tecido ovariano de cutia (*dasyprocta aguti linnaeus, 1766*)**. 2010.Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2010.
- WEBB R., ARMSTRONG D.G. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. **Livestock Production Science** v.53, p. 95–112. 1998.

WEEB, R.; CAMPBELL, B. K. **Mecanismo de seleção do folículo dominante e manutenção da qualidade do ovócito.** In: Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos. 2008. Uberlândia. Apostila (modulo leite). p.1-23. 2008.

WONGSRIKEAO, P.; OTOI, T.; KARJA, N.W.; et al. Effects of ovary time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. **Journal of Reproduction and Development.** v. 51, p. 87-97, 2005

YEOMAN, R.R.; WOLF, D.P.; LEE, D.M. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. **Fertility and Sterility,** v.83, p.1248-1254, 2005.